E&A

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

20 FEB
C.S.A. 121

. Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 3, n.° 5, p. 213-262 ★ Set./Out., 1961

O caminho certo na terapia da amebíase...

DIANTIL

(Clorbetamida)

Amebicida não-metálico...

de ação intensa...

com doses reduzidas

"Diantil é um amebicida sintético não-metálico que se caracteriza por grande atividade e baixa toxicidade". *E. W. Dennis e D. A. Berberian, Antibiotics & Chemotherapy, 6:554, maio, 1954.*

"O que mais sobreleva notar, no tratamento com Diantil, é sua perfeita tolerância." *D. T. Lucena e R. J. Marques, Revista Brasileira de Medicina, vol. XIII, n.º 11, nov. 1955.*

D I 1 - 60

Comprimidos contendo 0,5 g de N-(2,4-diclorobenzil)-N-(2-hidroxietil) dicloroacetamida. Caixas de 24

DIANTIL Marca registrada é um produto **WINTHROP**

Distribuidores: The Sydney Ross Co., Av. Rio Branco, 251, 11.º and., Rio de Janeiro

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(5):213-220, setembro-outubro 1961

CDU 576.895.75(816.3):
591.5
595.754.1-15

DADOS ECOLÓGICOS SÔBRE OS TRIATOMÍNEOS SILVESTRES NA ILHA DE SANTA CATARINA (BRASIL)

Hugo Leal, Joaquim A. Ferreira Neto e Casemiro M. Martins

RESUMO

Os autores fazendo pesquisas sistemáticas de animais silvestres na ilha de Santa Catarina (Município de Florianópolis), capturaram as seguintes espécies: gambá *Didelphis azarae azarae* Temm, gambá-mirim *Marmosa cinerea paraguayana* Tate e rato *Phyllomys dasylhrix* (Heusel, 1873). Foi observado que nos pomares e nos bananais êsses mamíferos são muito mais abundantes de que nas matas próximas.

Os ninhos que albergavam triatomíneos situavam-se em touceiras de gravatás (bromeliáceas) ou em buracos de pau. Entre êsses insetos predominou, de muito, o *Panstrongylus megistus* que em alguns ninhos foi encontrado juntamente com o *Rhodnius domesticus*. As duas espécies estavam parasitadas por tripanosomas do tipo *cruzi*, na proporção de, respectivamente, 40 e 70% dos exemplares examinados. Dos *P. megistus* capturados, 334 eram ninfas e 1, apenas, era adulto; entre os *R. domesticus* encontraram-se 10 ninfas e 36 adultos.

Foram, também, examinadas diversas dezenas de *P. megistus* adultos, capturados, pelos próprios moradores, em residências da ilha de Santa Catarina. Entre êsses insetos observou-se um índice de infecção de 40%.

INTRODUÇÃO

As extensas campanhas de desinsetização das moradias, realizadas nos últimos anos e, principalmente, as recentes tentativas de erradicação dos triatomíneos domiciliários (Freitas, Ferreira, Garcia & Haddad [2]), vieram despertar interêsse para o possível papel que poderiam desempenhar os focos extradomiciliários dêsses insetos, na reinfestação das moradias.

Freitas, Siqueira & Ferreira [3] ao relatarem observações feitas em focos encontrados em abrigos de diversos animais, dão uma visão geral dos conhecimentos existentes sôbre o assunto. Dá bem uma idéia da escassez de dados sôbre os triatomíneos silvestres, o número de exemplares de *Panstrongylus megistus* que foram relacionados nesse artigo: duas ninfas, capturadas pelos autores, e mais uma casca de ôvo e um adulto, encontrados por outros pesquisadores.

Em fevereiro de 1960, o Dr. Olímpio da Silva Pinto, então Diretor do Instituto Nacional de Endemias Rurais, sugeriu à Circunscrição Santa Catarina do DNERu a execução de pesquisas sôbre os triatomíneos silvestres da ilha de Santa Catarina (Município de Florianópolis). Êsses estudos e mais algumas observações relativas a triatomíneos remetidos pelos habitantes da referida ilha, constituem o objeto do presente artigo. Nêle as informações obtidas serão apresentadas em três grupos:

I — Hábitos dos animais silvestres;

II — Triatomíneos capturados em ninhos de animais;

III — Triatomíneos capturados em domicílio.

Departamento Nacional de Endemias Rurais, Florianópolis (Santa Catarina).

LEAL, H.; FERREIRA Neto, J. A. & MARTINS, C. M. — Dados ecológicos sôbre os triatomíneos silvestres na ilha de Santa Catarina (Brasil). Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:213-220, 1961.

A ilha de Santa Catarina situa-se junto à parte central da costa do Estado do mesmo nome; é cortada pelo paralelo 27°30'S e pelo meridiano de 48°30'W e mede cêrca de 50 km de comprimento por 15 km na maior largura. Essa ilha é formada de maciços montanhosos ligados entre si por terrenos relativamente planos. Entre aquêles, destaca-se uma serra com cêrca de 600 m de altitude, com direção N-S, que se prolonga por quase tôda a extensão da ilha. Os níveis mais altos ainda permanecem cobertos de vegetação florestal, ao passo que as encostas menos íngremes e as planícies são habitadas por uma população relativamente densa que descende dos colonos açorianos vindos no século XVIII. Êsses moradores dedicam-se à pesca, à lavoura, alguns associando essas duas atividades, porém a maioria dêles vive, sobretudo, da agricultura. Nas áreas abrangidas pela pesquisa a população cultiva, principalmente, banana, café, mandioca e feijão. Geralmente existe em tôrno das casas um cafèzal sombreado por bananeiras, árvores frutíferas e espécies silvestres. As residências são construídas de diversos materiais e têm vários graus de acabamento. Encontram-se moradias feitas de tijolo, com ou sem rebôco, de pau-a-pique com revestimento, ao que chamam, localmente, de estuque, ou então mistas, isto é, com uma parte de um material e o resto de outro. Em algumas áreas encontram-se, também, casas só de madeira e de pau-a-pique sem rebôco.

I — HABITOS DOS ANIMAIS SILVESTRES

O trabalho foi realizado entre fevereiro e agôsto de 1960 e a procura de animais silvestres estendeu-se a uma distância de cêrca de 300 m das habitações. A prática mostrou que dentro dêsse raio era maior a probabilidade do encontro de ninhos de animais e que a captura é mais rendosa nos pomares e na orla dos capões de mato. No interior dêsses capões e nas matas primárias, ainda existentes na ilha, os animais são mais raros.

Durante tôda a pesquisa que se estendeu por vários distritos do município de Florianópolis foram encontradas as seguintes espécies: gambá *Didelphis azarae azarae* Temm; gambá-mirim *Marmosa cinerea paraguayana* Tate; rato *Phyllomys dasylhrix* (Heusel, 1873); rato de barriga branca, doméstico, *Rattus r. frugivorus* (Raf.). As determinações específicas são devidas ao Prof. Fernando Pires, do Museu Nacional, Rio de Janeiro. Todos os animais foram capturados à mão; a maioria, porém, foi derrubada por meio de funda.

a) Gambá — *Didelphis azarae azarae*

Os ninhos são encontrados geralmente em touceiras de gravatás (bromeliáceas) ou em buracos de árvores; estas, em sua maioria, são ingàzeiros que servem de sombra aos pés de café. Mais raramente são vistos no alto das árvores em ninhos semelhantes aos das cuícas. É comum o encontro de pedaços de fôlhas de bananeira pendurados na entrada dos ninhos. Nas touceiras de gravatás, os animais cortam a base de alguns pés da parte central e escavam um salão pouco maior do que o corpo (fig. 1), onde fazem uma cama de fôlhas sêcas. Todos os animais capturados foram encontrados a sós. Os moradores do local informam que êsses gambás se alimentam de diversas frutas, principalmente de bananas, de pequenos mamíferos e de aves que podem atingir até o porte da galinha.

Fig. 1

Em ranchos de pau-a-pique (paredes de sopapo) construídos para abrigar carroças e engenhos de farinha, foram encontrados ninhos de gambás, todos porém abandonados e sem triatomíneos.

b) Gambá-mirim — *Marmosa cinerea paraguayana*

A maioria foi encontrada em tôcos de bananeiras, apenas uns poucos estavam abrigados em ôcos de paus. Depois de cortada a bananeira para a colheita, o tôco que resta se decompõe, primeiramente na parte central, ficando ôco. Para êsse buraco o gambá-mirim carrega fôlhas sêcas e faz o seu ninho. Em geral vivem aos casais e fazem criação tanto nos tocos de bananeiras como nos buracos de pau. O número máximo de exemplares, de diversos tamanhos, encontrado em cada um dêsses tipos de ninhos foi, respectivamente, de sete e cinco. Os ninhos achados em abandono, nos tocos de bananeiras, estavam todos excessivamente úmidos. Capturou-se um gambá-mirim num ninho construído dentro de um cacho de bananas. Descobriu-se, também, um ninho habitado no fôrro de uma casa; apesar de ter sido feita uma procura cuidadosa nas palhas dêsse ninho, não foram encontrados nem triatomíneos vivos nem vestígios de exúvias.

É um animal lerdo como o gambá, porém, quando acuado, se torna agressivo. Usa alimentação semelhante à do gambá, mas não chega a atacar animais de maior porte, como galinha. Não é caçado nem usado como alimento pela população local.

c) Rato — *Phyllomys dasylhrix*

Os ninhos onde havia filhotes estavam, em sua maioria, em touceiras de gravatás; apenas um pequeno número situava-se em ôcos de pau. Onde havia cria estava sempre o casal, caso contrário encontravam-se isolados. No alto de árvores com muitas ramagens ou com plantas trepadeiras existem, às vêzes, diversos ninhos feitos de palha, como os de pássaros; nêles, um buraco dá acesso a um salão onde fica a cama de fôlhas sêcas. Para cada cinco ou mais dêsses ninhos, um apenas estava habitado. Quando se toca num que está ocupado, o rato corre ràpidamente para outro ninho próximo.

É um animal mais arisco do que o gambá e, quando apedrejado, se recupera ràpidamente. Não pode ser capturado pela cauda, porque esta se destaca do corpo com muita facilidade.

Come diversas frutas e, segundo informa a população local, não ataca outros animais. As crianças gostam de caçá-lo, porém não existe, na ilha, o hábito de comer êsse animal.

Um fato observado em todos os ninhos foi a presença de grande quantidade de formigas. Nenhuma das espécies é vista fora dos ninhos durante o dia, porém, circulam durante todo o correr da noite.

No Quadro I vê-se que as três espécies mais numerosas foram encontradas em diversos distritos, o que é um fato indicativo de sua presença em tôda a zona rural da ilha. Os totais de ninhos pesquisados revelam a grande abundância dêsses animais, pois o trabalho durou apenas seis meses e foi executado por pessoas que nunca se tinham dedicado a tarefa idêntica. Nesse quadro não figura o número de animais surpreendidos nos abrigos porque muitos fugiram, impedindo assim a sua contagem exata.

II — TRIATOMÍNEOS CAPTURADOS EM NINHOS DE ANIMAIS SILVESTRES

a) *Pesquisas de triatomíneos*

No início da pesquisa, procuraram-se triatomíneos em todos os lugares que pudessem servir de habitáculo a êsses insetos. Nessa tarefa preliminar foram examinados, após a aplicação de pó insetífugo ("Pirisa" — Píretro Industrial S.A.), os seguintes abrigos: 160 frinchas de pedras, 66 tocas situadas em pedras, 30 galinheiros e 16 ranchos de pau-a-pique. Também foram inspecionados visualmente os seguintes objetos: 1.215 tocos de bananeiras, 56 ninhos de pássaros, 5 palmeiras (côco de cachorro) e 2 buracos de tatu. Em todo o decorrer do trabalho só foram encontrados triatomíneos em ninhos situados em ôcos de árvores e em touceiras de gravatás. Nos ninhos encontrados em outros locais, como tocos de bananeiras, galhos de árvores, etc., apesar de terem sido feitas pesquisas cuidadosas, não se encontrou "barbeiros" ou restos de exúvias.

QUADRO I

Ninhos de animais silvestres pesquisados na ilha de Santa Catarina (Município de Florianópolis) e percentagem dos que estavam habitados.

DISTRITOS	*Didelphis azarae azarae*			*Marmosa cinerea paraguayana*			*Phyllomys dasylhrix*		
	Nº de ninhos			Nº de ninhos			Nº de ninhos		
	Pesquisados	Habitados	%	Pesquisados	Habitados	%	Pesquisados	Habitados	%
Canasvieiras	36	8	22	102	43	42	160	83	52
Lagoa	15	6	40	2	1	50	10	5	50
Inglêses do Rio Vermelho	—	—	—	2	—	—	11	3	27
Ratones	—	—	—	1	—	—	4	1	25
Ribeirão da Ilha	3	1	33	4	—	—	26	19	73
Florianópolis	3	3	100	—	—	—	—	—	—
Totais	57	18	32	111	44	40	211	111	53

QUADRO II

Tipos de habitáculos e distância das moradias humanas, de ninhos com triatomíneos.

ANIMAIS	Nº total de ninhos	Em gravatás				Em ôcos de árvores			
		Distância em metros				Distância em metros			
		0 a 10	11 a 50	51 a 100	+ de 100	0 a 10	11 a 50	51 a 100	+ de 100
Phyllomys dasylhrix	16	2	1	—	7	1	1	2	2
Didelphis azarae azarae	3	—	—	—	—	—	1	—	2
Marmosa cinerea paraguayana	1	—	—	—	—	—	—	—	1
Rattus r. frugivorus	1	—	1	—	—	—	—	—	—

Para a procura de triatomíneos, a palha dos ninhos era trazida para o chão e depois separada uma a uma. No caso das touceiras de gravatás, as fôlhas eram, também, arrancadas uma de cada vez. Além dos insetos vivos foram encontradas muitas exúvias, porém nunca foram vistos ovos ou suas cascas. Um pequeno número de ninhos, já abandonados, albergava ainda triatomíneos.

Os ninhos que albergavam triatomíneos situavam-se a diferentes distâncias das habitações; o mais próximo, pertencia a um

gambá e estava numa touceira de gravatá a 8 m da casa. Esta distância do ninho à residência do morador foi avaliada apenas para uma parte dos animais encontrados. Êsses dados figuram no Quadro II que registra sòmente ninhos onde havia triatomíneos.

No Quadro III estão os triatomíneos capturados em ninhos de cada uma das espécies. A baixa percentagem de ninhos de gambás-mirim albergando êsses insetos decorre de não terem sido encontrados triatomíneos em tocos de bananeiras, habitáculos preferidos por êsses animais. Não foi encontrado nenhum ninho tendo sòmente o *Rhodnius domesticus;* em todos em que havia essa espécie encontrava-se, também, o *Panstrongylus megistus.* Parece que o *P. megistus* abandona o ninho logo após a última ecdise, pois o único exemplar adulto capturado apresentava aspecto de ter recém-atingido a fase alada. O número máximo, de *P. megistus,* encontrado foi de 40 em um ninho de ôco de pau; nessa mesma árvore havia mais três ninhos, todos com exemplares dessa espécie que, reunidos aos primeiros, somaram 84 insetos. Os *R. domesticus* foram localizados, principalmente, em touceiras de gravatás; só um ninho de ôco de pau albergava essa espécie. Numa dessas touceiras foram encontrados 18 exemplares, 14 adultos e 4 ninfas, além de 14 *P. megistus.*

b) *Pesquisa de tripanosomas do tipo "cruzi"*

Alguns exemplares de *P. megistus* e *R. domesticus* foram remetidos ao pesquisador Archibaldo B. Galvão, que diagnosticou os flagelados como tripanosomas do tipo *cruzi.*

As fezes, para pesquisa de tripanosoma, foram obtidas por compressão do abdome, recolhidas em solução fisiológica e examinadas a fresco entre lâmina e lamínula. As lâminas positivas foram coradas pelo Giemsa. Em tôdas as preparações verificou-se que os tripanosomas eram indistinguíveis do *T. cruzi.* No Quadro III figuram os resultados dêsses exames, menos os de três ninfas de *P. megistus* encontradas em ninhos de rato, todos negativos. Destaca-se nesses dados, o fato de tôdas as ninfas de *P. megistus* procedentes de ninhos de gambá, ao todo 69, estarem positivas. Deve-se declarar que foi examinado um mínimo de três esfregaços de sangue tirado da cauda de 16 gambás, com apenas 3 resultados positivos. Nos ninhos dêsses três gambás positivos não havia triatomíneos, o que não é de estranhar porque o encontro de uma alta percentagem de ninhos vazios indica freqüentes mudanças de abrigo. Nos ninhos de *Phyllomys dasylhrix* os índices de positividade foram menores, apesar de aí terem sido encontradas duas espécies de triatomíneos. Dentre os insetos capturados em abrigos de gambás-mirim nenhum estava parasitado. O fato das ninfas de *R. domesticus* examinadas terem fornecido maior índice de infecção do que os adultos decorre do tamanho das amostras.

No Quadro IV estão os índices de positividade encontrados nos diversos distritos da ilha. Êsses valores não parecem ser significativos, uma vez que nas duas localidades em que os *P. megistus* estavam negativos, os únicos ninhos encontrados habitados eram de *Phyllomys dasylhrix* (Quadro I), espécie cujos ninhos forneceram triatomíneos com baixos índices de positividade. Êsses dados são mais um exemplo da incerteza apresentada pelos índices de infecção obtidos com amostras pequenas. Outro exemplo é dado pelos valores encontrados nos *R. domesticus* (38% em uma localidade e 100% em outra).

III — TRIATOMÍNEOS CAPTURADOS EM DOMICÍLIO

Em fins de 1959, depois de uma reportagem sôbre a doença de Chagas publicada numa revista do Rio de Janeiro e de uma nota de caráter alarmista divulgada pela imprensa de Florianópolis, começaram a chegar ao Laboratório do DNERu. triatomíneos enviados por pessoas que os tinham encontrado em suas residências. Todos êles eram *P. megistus* adultos capturados no interior das casas, com exceção de duas ninfas, uma encontrada num rancho e outra numa coelheira. Êsses insetos chegaram em vários graus de ingurgitamento e os portadores de cinco dêles informaram ter capturado o inseto sugando pessoas.

No Quadro V figuram os distritos de onde provieram êsses *P. megistus* e seus índices

QUADRO III

Triatomíneos capturados em ninhos de animais silvestres e sua positividade para tripanosomas do tipo *cruzi*.

ANIMAIS	Ninhos habitados			*Panstrongylus megistus*						*Rhodnius domesticus*					
	Total	Com triatomíneos		Ninfas			Adultos			Ninfas			Adultos		
		Nº	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivos	%
Didelphis azarae azarae	18	7	39	69	69	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Marmosa cinerea paraguayana	44	1	2	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phyllomys dasylhrix	111	30	27	245*	40	22	1	—	—	10**	6	86	36***	24	77
Totais	173	38	22	334	109	40	1	—	—	10	6	86	36	24	77

Obs.: — * Examinados 180 exemplares ** Examinados 7 exemplares *** Examinados 31 exemplares

QUADRO IV

Infecção por tripanosoma do tipo *cruzi* em triatomíneos capturados em diferentes Distritos.

DISTRITOS	*Panstrongylus megistus*				*Rhodnius domesticus*			
	Capturados	Examinados	Positivos	%	Capturados	Examinados	Positivos	%
Canasvieiras	163*	146	34	23	13	13	5	38
Lagoa	67	67	48	72	—	—	—	—
Ingleses do Rio Vermelho	24	4	—	—	—	—	—	—
Ratones	22	22	—	—	2	—	—	—
Ribeirão da Ilha	34	8	2	25	31	25	25	100
Florianópolis	25	25	25	100	—	—	—	—
Totais	335	272	109	40	46	38	30	74

Obs.: — * Nesse total há um adulto positivo em ninho de *Phyllomys dasylhrix*.

QUADRO V

Triatomíneos capturados em domicílio, pelos habitantes da ilha de Santa Catarina, e sua infecção por tripanosomas do tipo *cruzi*.

DISTRITOS	*Panstrongylus megistus*			
	Capturados	Examinados	Positivos	%
Canasvieiras	51	33	19	58
Lagoa	7	7	4	57
Inglêses do Rio Vermelho	1	—	—	—
Ratones	2	1	—	—
Ribeirão da Ilha	11	9	1	11
Florianópolis	8	6	—	—
Santo Antônio de Lisboa	9	3	1	33
Totais	89	59	25	42

de infecção para tripanosomas do tipo *cruzi*. Deve ser destacado o encontro de um exemplar, na zona urbana de Florianópolis, dentro do quarto de um hotel que ocupa um prédio de sete andares.

No Quadro VI estão os meses em que êsses insetos apareceram dentro das casas e as temperaturas médias ocorridas nesses períodos. O encontro dêsses insetos dentro das moradias deu-se, apenas, nos meses mais quentes, como já tinha sido assinalado por Di Primio [1] no Rio Grande do Sul. Entretanto, o que foi observado nos ninhos de animais silvestres põe de lado a hipótese de hibernação, aventada por êsse autor, pois a pesquisa alcançou os meses mais frios e sempre os triatomíneos mostravam-se muito ativos.

QUADRO VI

Captura de *Panstrongylus megistus* dentro dos domicílios, na Ilha de Santa Catarina, segundo a época do ano.

MÊS	Nº de *Panstrongylus megistus* por ano			Normais de temperatura de Florianópolis * (ºC)
	1959	1960	1961	
Janeiro	—	27	2	24,4
Fevereiro	—	13	1	24,6
Março	—	6	2	23,7
Abril	—	3	—	22,0
Maio	—	—	—	19,2
Junho	—	—	—	16,9
Julho	—	—	—	16,3
Agôsto	—	—	—	16,9
Setembro	—	—	—	17,8
Outubro	—	—	—	19,2
Novembro	—	2	—	21,3
Dezembro	32	1	—	23,2

* Fonte: Ministério da Agricultura, Serviço de Meteorologia. Normais climatológicas. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola, 1941.

O fato do inseto penetrar nas casas com certa freqüência não parece ser uma indicação de que êle se esteja adaptando aos domicílios, como tem sido sugerido por alguns pesquisadores. Fala contra essa idéia o fato de que, apesar de terem sido descobertos animais em vários tipos de abrigo, sòmente em dois biótopos, o buraco de árvore e a touceira de gravatá, foram achadas colônias de triatomíneos. Deve ser lembrado, também, o encontro de vários ninhos de gambás dentro de ranchos e de um habitado por gambá-mirim no fôrro de uma casa, todos êles sem o menor sinal de infestação.

CONCLUSÕES

Algumas peculiaridades no uso da terra, pelos sitiantes da ilha de Santa Catarina, como o cultivo de pomares, a plantação de banana e a lavoura de café sombreado, propiciaram condições para que algumas espécies de animais silvestres, que se alimentam, no todo ou em parte, de frutas, se tornassem muito mais numerosas do que o são dentro das matas. Além disso, o gambá e o gambá-mirim foram encontrados em abrigos que não existem dentro da floresta e também em construções feitas pelo homem. Os triatomíneos, ao contrário, só foram vistos em biótopos semelhantes aos existentes nas florestas, o que, no caso do *P. megistus*, contrasta com o seu comportamento em outras regiões onde prolifera até nos domicílios. É difícil dar uma explicação para êsse fato, pois os próprios ninhos de animais encontrados nos galhos de árvores, onde nunca se constatou a presença de triatomíneos, não parece ser uma particularidade da vida dêsses mamíferos na vegetação secundária.

A raridade do encontro de *P. megistus* adultos nos abrigos de animais justifica o fato dêsses insetos, pouco numerosos como são, aparecerem ocasionalmente dentro das casas. O número dêsses triatomíneos trazidos espontâneamente ao DNERu. autoriza que se considere a doença de Chagas, na ilha, como um acidente de baixa probabilidade, porém de ocorrência possível. Esta assertiva é confirmada por um caso positivo para doença de Chagas encontrado em recente inquérito sorológico escolar realizado no município de Florianópolis (dado inédito).

SUMMARY

Ecologic data on wild triatomae in the island of Santa Catarina (Brazil).

The authors present the results of systematic searches made upon wild animals in the island of Santa Catarina, county of Florianópolis, capital of the State of Santa Catarina (Brazil).

The habits of following animals were studied: *Didelphis azarae azarae* Temm; *Marmosa cinerea paraguayana* Tate and *Phyllomys dasylhrix* (Heusel, 1873). It was observed that these mammals are much more abundant in orchards than in the forests.

The nests which lodged triatomae were sited in stumps of bromeliaceae and holes of trees. Among those insects *Panstrongylus megistus* was prevailing and, in some nests, was found together with *Rhodnius domesticus*. Both species were parasitized by trypanosomes of the *cruzi* type, in the proportion of, respectively, 40 and 70 per cent of the insects examined.

Among the *P. megistus* captured, 334 nymphs and 36 adults were found.

About one hundred adult *P. megistus* captured by inhabitants of the island in their dwellings were also examined. Among these insects the infection index was of 40 per cent.

REFERÊNCIAS

1. DI PRIMIO, R. — Contribuição para o estudo do *Panstrongylus megistus* no Rio Grande do Sul. An. Fac. Med. Pôrto Alegre **18**: 37-40, 1959.

2. FREITAS, J. L. P.; FERREIRA, D. A.; GARCIA, G. G. & HADDAD, N. — Combate intensivo aos triatomíneos de hábitos domiciliários. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**: 100-107, 1960.

3. FREITAS, J. L. P.; SIQUEIRA, A. F. & FERREIRA, D. A. — Investigações epidemiológicas sôbre triatomíneos de hábitos domésticos e silvestres com auxílio da reação de precipitina. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**: 90-99, 1960.

Recebido para publicação em 21 julho 1961.

Rev Inst. Med. trop. São Paulo
3(5):221-229, setembro-outubro 1961

CDU 591.557:594.381
:616.995.122

TEORIA DAS BIOMASSAS ESTACIONÁRIAS SUJEITAS À AÇÃO PARASITÁRIA

Ecologia do complexo nosológico da bilharziose mansônica

Aluízio Bezerra Coutinho [1] e Pe. José Nogueira Machado, S.J. [2]

RESUMO

Demonstram os autores as conseqüências das modificações dos elementos dos biótopos nas biomassas.

Variando algum ou alguns dos parâmetros, o valor da biomassa sofrerá alterações, dependendo estas da intensidade da variação.

Esta modificação refletir-se-á no número de indivíduos, na estrutura etária ou mesmo nos caracteres mensuráveis, quando proporcionais à duração da vida.

Transferindo êsses conceitos para o estudo dos moluscos planorbídeos, transmissores da bilharziose mansônica, concluem que há uma correlação de proporcionalidade inversa entre o tamanho máximo atingido na população da mesma espécie, medido no diâmetro maior da concha, e a freqüência relativa (percentual) de infestação dos moluscos por larvas de trematódeos.

INTRODUÇÃO

...sed omnia in mensura et numero et pondere disposuisti...
(Sapientia, XI-21)

A ocorrência de qualquer espécie de seres vivos está condicionada à existência atual de condições mesológicas que atendam tôdas as funções orgânicas dos indivíduos da espécie considerada. O conjunto destas condições deve corresponder à totalidade das exigências funcionais para que possa haver perpetuação da espécie, sòmente possível enquanto elas forem e permanecerem propícias.

A enumeração de tôdas as condições ecológicas propiciantes define completamente o nicho ecológico da espécie considerada. Como a definição de espécie implica na existência de propriedades comuns a todos os indivíduos de seu domínio, segue-se que a cada espécie deva corresponder um certo nicho ecológico próprio, diverso dos pertencentes a qualquer outra espécie, pelo menos no que concerne aos conjuntos de seres vivos de uma região geográfica.

A ocorrência dos nichos ecológicos depende da reunião dos fatôres materiais que atendem às necessidades dos indivíduos da espécie, e, por isso mesmo, deve satisfazer preliminarmente à condição de nunca ter capacidade inferior à necessária para sustentar o número mínimo de indivíduos. suficiente para assegurar a reprodução em face das possibilidades de extinção eventual.

As ocorrências dos nichos ecológicos definem os "habitats" das espécies, e cada ocorrência contínua, unitária, de um "habitat", abrigando uma população de uma espécie, é uma unidade biotópica, ou um "biótopo".

Cada biótopo é capaz de abrigar uma população cujo conjunto de matéria viva, ou

(1) Faculdade de Medicina da Universidade do Recife, Pernambuco.
(2) Faculdade de Filosofia Manoel da Nóbrega, Recife, Pernambuco.

seja, a soma das massas de todos os indivíduos da espécie que a compõe, é a "biomassa", cujo valor é independente da maneira como se reparte em indivíduos, de forma que a mesma biomassa pode estar distribuída tanto em um número pequeno de indivíduos grandes, como em um número grande de indivíduos pequenos.

Um biótopo que abrigue uma biomassa cujo valor se mantenha constante e correspondente ao máximo possível, forma uma ocorrência estável, qualquer que seja a variação numérica de sua população. A estabilidade de uma ocorrência depende da constância dos valores dos parâmetros do biótopo, correspondentes às condições necessárias para a satisfação das exigências fisiológicas da espécie formadora da biomassa. Variando algum ou alguns dêstes parâmetros, variará subseqüentemente o valor da biomassa, e o tempo necessário para ser atingido o equilíbrio correspondente à nova situação de ocorrência estável será maior ou menor, conforme a espécie formadora da biomassa e a amplitude da variação paramétrica, fazendo-se o reajustamento mediante eliminação ou incremento numérico ou ponderal de indivíduos, conforme o caso.

Quando uma ocorrência estável de uma espécie, uma biomassa, é observada em duas ocasiões separadas por um determinado intervalo de tempo, de ordem de grandeza comparável ou superior à da duração média de vida dos indivíduos da espécie, esta biomassa, embora permanecendo constante, não se apresenta constituída pelos mesmos indivíduos nas duas observações. Os que morreram durante o intervalo foram substituídos por novos exemplares. Mas, por elevada que seja a fecundidade da espécie, a biomassa permanece constante, não obstante as substituições havidas, não havendo necessàriamente manutenção do número de indivíduos. A manutenção da constância da biomassa é a expressão do equilíbrio estacionário, cujas entradas consistem no nascimento de novos indivíduos, e saídas, na eliminação por morte entre os que existiam. Esta substituição de indivíduos ao longo do tempo acarreta a estrutura estratificada das populações, que são assim constituídas por grupos etários de número decrescente de indivíduos. O estrato mais jovem na escala das idades é necessàriamente o mais numeroso. O número de indivíduos no grupo etário mais velho, tende para um. Cada um dos grupos etários, em uma dada ocasião, apresenta-se, quanto ao número de indivíduos, em estado correspondente à idade que o define, ou seja, ao número dos componentes do grupo etário imediatamente mais jovem, diminuído de tantos indivíduos quantos tenham sido atingidos pela morte no período de idade anteriormente vivido. Portanto a estrutura de uma população em equilíbrio estacionário, a chamada pirâmide demográfica, é equivalente à soma dos estados sucessivos da evolução de um grupo etário, considerado desde sua origem à sua extinção. O estudo da dinâmica das transformações por que passa um grupo etário é, portanto, apto a representar a estrutura etária de uma biomassa em condições de evolução idêntica. Assim, qualquer alteração que promova a da idade do último sobrevivente, no momento de sua extinção, será causa de alteração correspondente na composição da biomassa.

Torna-se portanto possível a elaboração de um modêlo da estrutura de uma população ocupante de um biótopo e em equilíbrio com êle. Para tanto, admitir-se-á que as perdas de indivíduos por morte, sejam constantes e proporcionais em todos os estratos etários da população. Considerar-se-á que na biomassa M, a evolução dos grupos etários se faça dentro de um certo grau aproximado de continuidade e derivabilidade em relação ao tempo.

Seja C_t um grupo etário de M, criado na data t_o.

Designemos por λ o decréscimo de C_t em indivíduos, por unidade de tempo em conseqüência da morte.

Evidentemente é, ou supõe-se

$$1 > \lambda \geqslant 0$$

pois um decréscimo igual a 1 implicaria em extinção imediata de C_t, e um menor que zero implicaria absurdo.

Na duração elementar dt, a variação de C_t é:

$$dC_t = -\lambda C_t dt$$

o que dá para o fenômeno uma equação diferencial:

$$\frac{dC_t}{dt} + C_t = 0$$

A solução geral desta equação é:

$$C_t = C_o e^{-\int \lambda dt}$$

ou, como λ foi admitido constante,

$$C_t = C_o e^{-\lambda t}$$

do tipo ordinário das equações de sobrevivência (desintegração radioativa, etc.), cujo gráfico está representado na Fig. 1.

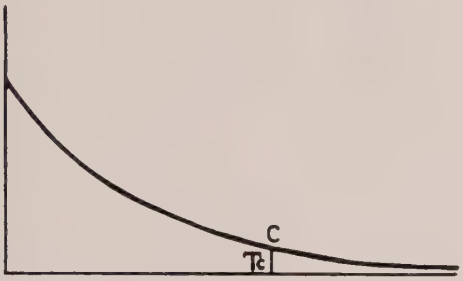

fig. 1

Chame-se c um valor de C_t considerado pràticamente mínimo final antes da extinção, e T_c a duração ou idade requerida para ser atingido êsse mínimo. Então, sempre para λ constante,

$$c = C_o e^{-\lambda T_c}$$

$$\log\ c = \log\ C_o - \lambda\, T_c$$

$$T_c = \frac{\log \dfrac{C_o}{c}}{\lambda} \qquad (1)$$

sendo o numerador, e, portanto, tôda a fração > 0.

$T_c = f(\lambda)$ corresponde a uma hipérbole equilátera referida às assintotas (Fig. 2).

Considere-se agora que λ, ou seja, a mortalidade, pode ser decomposta em *p*, mortalidade específica, certa, por causa determi-

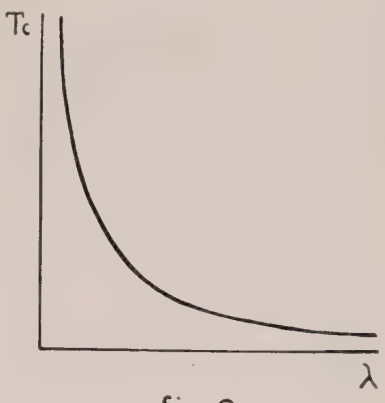

fig. 2

nada sempre reconhecível, e portanto estimável, e *m*, mortalidade por tôdas e quaisquer outras causas. Nestas condições,

$$\lambda = m + p - mp$$

e considerando então $T_c\, f(m)$ ou $T_c\, f(p)$, passa a corresponder à mesma espécie de curva, porém com deslocamento para a esquerda, cortando o eixo dos T_c (Fig. 3).

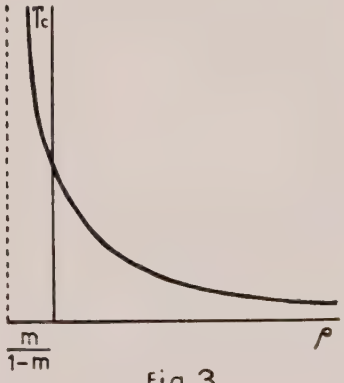

fig. 3

Então para

$$T_c = f(p) = \frac{\dfrac{1}{1-m} \log \dfrac{C_o}{c}}{p + \dfrac{m}{1-m}} \qquad (2)$$

onde $\dfrac{m}{1-m}$ dá a medida do deslocamento horizontal.

As equações 1 e 2 dão, portanto, os valores máximos de idade atingidos pela população de uma biomassa em equilíbrio estacionário para valores de mortalidade geral (equação 1), ou mortalidade específica por uma causa reconhecível determinada (equação 2).

Consideremos agora um caráter mensurável qualquer, proporcional à idade dos indivíduos da biomassa. Nessas condições, os valores dêsse caráter podem ser tomados como a medida da idade dos indivíduos, e corresponderão aos dos T_c nos indivíduos com os valores máximos do caráter considerado. Nos organismos onde se observa crescimento corporal contínuo, onde por conseqüência os indivíduos mais velhos são os maiores, a substituição de T_c na fórmula pela medida do caráter proporcional à idade, pode ser feita. O mesmo, òbviamente, acontecerá com caracteres simplesmente enumeráveis, desde que satisfaçam a condição de proporcionalidade à duração da vida. Neste último caso estão, a título de exemplo, anéis anuais de crescimento nas madeiras, camadas concrecionais dos otólitos de peixes, e, no caso anterior, as medidas de dimensões corporais, como o comprimento, nos répteis, ou o diâmetro da concha em gastrópodos planorbídeos, etc.

ECOLOGIA DA BILHARZIOSE MANSÔNICA

Em três ocorrências de caramujos planorbídeos implicados na transmissão da bilharziose mansônica, estudadas por um de nós e colaboradores, em 1938-1939 [3], encontramos as primeiras indicações do efeito das variações dos componentes de λ sôbre a estrutura das biomassas. Verificamos a existência de uma correlação de proporcionalidade inversa entre o tamanho máximo atingido na população, medido no diâmetro maior da concha, e a freqüência relativa (percentual) de infestações por larvas de trematódeos. Embora a significação do fato nos parecesse clara, havia dificuldades motivadas pelo estado caótico da taxeonomia dêste grupo de moluscos, que, até o momento, não parece ter diminuído. O grande número de nomes, pràticamente quase todos estabelecidos na base de tamanhos de concha, ou, mais recentemente, variações biométricas não analisadas, ou ainda mutações ineptas, poderia dar motivo a dúvidas quanto à existência do efeito, visto que, se as ocorrências por nós estudadas não fôssem de organismos da mesma espécie, não haveria motivo para se admitir a existência do efeito ecológico suspeitado. Enquanto alguns malacologistas promoviam a gêneros diferentes seres dantes havidos como espécies separadas de um mesmo gênero, nós não víamos como serem outra coisa senão meros ecótipos da mesma espécie, diferindo sòmente pelos tamanhos máximos que as condições ecológicas permitiam atingir, sendo estas condições não parâmetros vagos e mal definidos, como "meio", etc., porém valores suscetíveis de estimativa tão precisa quanto se quiser, como a freqüência da infestação sabidamente mortal e sempre identificável com facilidade, por fases larvárias de trematódeos digenéticos.

A partir de 1952, graças à ajuda do Conselho Nacional de Pesquisas e da Reitoria da Universidade do Recife, pudemos retomar os trabalhos. Primeiramente procuramos nos certificar de que nas ocorrências em que trabalhamos havia uma só espécie, não importando a larga divergência de tamanhos máximos atingidos. Verificamos que exemplares provenientes de locais onde os maiores não excediam de 10 mm de diâmetro, e por isso fazendo jus à denominação específica "centimetralis", conforme LUTZ, uma vez transferidos para ambientes artificiais propícios, onde ficavam subtraídos à ação letal da infestação trematódica, ou seja, ao efeito de p sôbre a população (equação 2), cresciam até os mesmos tamanhos observáveis nos exemplares de planorbídeos tidos como das "espécies" "guadalupensis", "olivaceus", etc. Tampouco pudemos descobrir diferenças anatômicas justificadoras de inclusão em binômios diferentes. Também pudemos averigüar, pela utilização do albinismo como gene marcador, mediante hibridações apropriadas, que TÔDAS as ocorrências de caramujos com que trabalhamos consistiam em organismos de patrimônio genético comum. entrecruzando-se livre e plenamente, uma vez postos juntos. Não temos, portanto, nenhum motivo para duvidar da uniespecificidade de nosso material, e portanto da legitimidade

QUADRO

Tamanhos máximos e freqüência relativa de infestação trematódica em *Australorbis glabratus*, Pernambuco, Brasil.

Nº	BIÓTOPO	Diâmetro máximo (mm)	Infestação (%)
1	Pontezinha (1939)	30,0	0,61
2	Parque do Amorim V	28,0	1,38
3	Rio Tapado	26,0	1,36
4	Parque do Amorim III	26,0	1,39
5	Parque do Amorim II	23,0	1,82
6	Parque do Amorim I	20,0	2,36
7	Salgadinho II	14,0	3,50
8	Salgadinho I-a	14,0	4,30
9	Caiçara II	12,0	4,51
10	Caiçara I (1939)	11,0	5,95
11	Salgadinho I-b	10,5	6,00
12	Edgard Werneck	10,0	8,34

de nosso tratamento. Se, por acaso, existe ou existira algures legítimos representantes dos nomes descritos pela multidão de malacólogos é problema dêles, não nosso, que tratamos com exemplares de caramujos de um mesmo patrimônio genético, altamente uniforme, muito menos variável que o de grande número de espécies vivas outras, que ninguém ousa pensar em subdividir. Por nos parecer mais cômodo, e por concordar com as particularidades anatômicas que chegamos a observar, usamos para êste planorbídeo o nome *Australorbis glabratus* [2, 4].

Utilizando o critério definidor de biomassa em equilíbrio estacionário, pudemos estudar de modo satisfatório dez novas ocorrências que, adicionadas às duas utilizáveis do trabalho de 1939, perfazem o total de doze ocorrências onde os diâmetros máximos variam de 30 mm a 10 mm, e a infestação relativa, por larvas de trematódeos, respectivamente, de 0,61 a 8,34%.

Os resultados obtidos estão especificados no Quadro, e ajustam-se muito bem ao segmento de hipérbole equilátera teórico, como se vê no gráfico da Fig. 4.

A perduração de uma biomassa exige que uma parte dos indivíduos que a integram exerçam atividade reprodutiva, sendo o valor dêste subconjunto tanto maior quanto menor a fecundidade de seus componentes. Ora, a atividade reprodutora, da qual depende a fecundidade, sòmente se instaura depois de atingido um certo grau de desenvolvimento, quer referente ao tamanho, quer à diferenciação, e isto é válido inclusive para

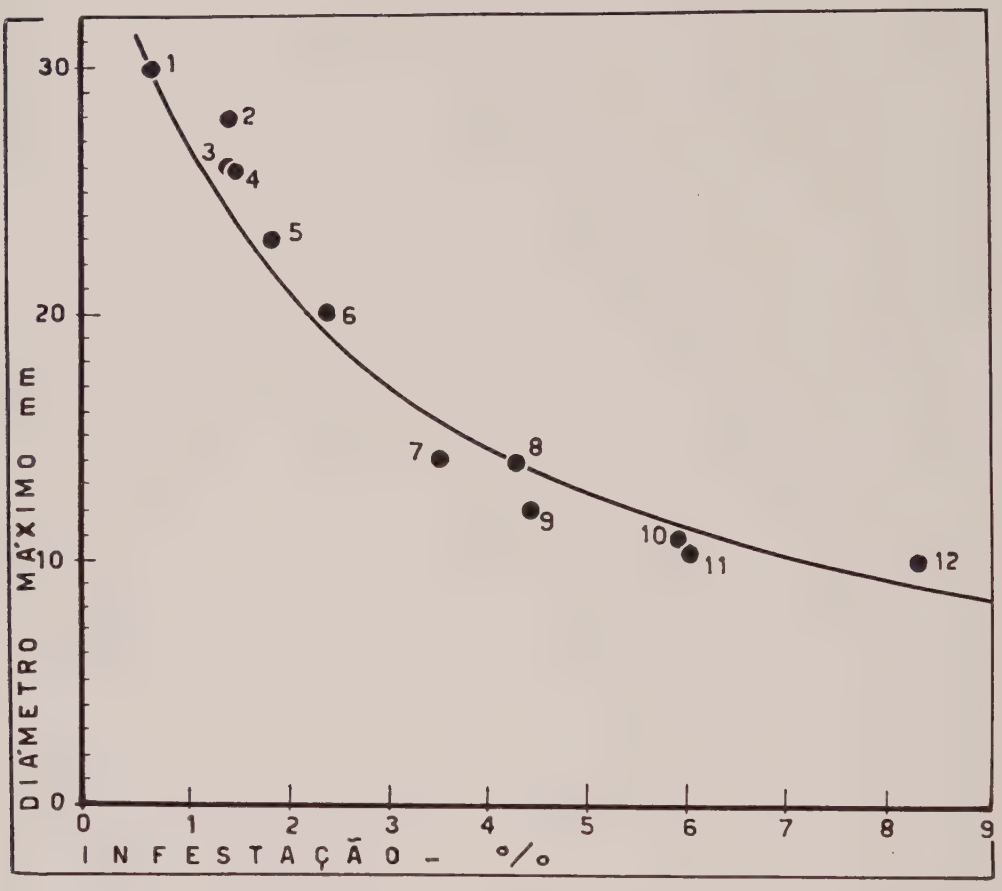

Fig. 4 — Gráfico representando a curva teórica e os dados referentes a 12 populações de *Australorbis glabratus*, em equilíbrio estacionário, estudadas no Estado de Pernambuco, Brasil. Os números dos pontos representados correspondem aos dos biótopos enumerados na tabela.

organismos de reprodução vegetativa, por simples fissão. A atuação do parasitismo trematódico em populações de planorbídeos, se suficientemente intensa, pode comprometer a viabilidade das biomassas, por acarretar a redução das idades máximas atingidas (os T_c), ou seja, dos diâmetros de conchas, abaixo do valor crítico representado pela idade da maturação sexual e seu correspondente diâmetro de concha. Para o caso, o diâmetro correspondente à idade em que se observam gônadas — ovotéstis — ativas, no *Australorbis glabratus*, orça em tôrno de três milímetros. A ocorrência de taxas de infestação trematódica que levem a diâmetros máximos inferiores a êste produzirá diminuição drástica do potencial reprodutivo, extinção da biomassa, ou, pelo menos, redução numérica tal que torna pràticamente impossível o achado de exemplares.

Podemos, portanto, estabelecer que a manutenção de um regime de taxas elevadas de infestação trematódica é incompatível com a manutenção de populações apreciáveis de *Australorbis*. Como os trematódeos adultos, parasitos de vertebrados, têm longevidade de ordem de grandeza comparável à de seus hospedeiros, e são altamente fecundos, com grande produção, e eliminação incessante, de ovos viáveis, segue-se que a probabilidade de infestação dos caramujos de um biótopo é tanto maior quanto maior fôr o número e variedade de vertebrados portadores das for-

mas adultas dos vermes, que freqüentem a localidade onde se situe o biótopo. Pode-se dizer que seja uma função diretamente proporcional à luxuriância da fauna local. Devemos, portanto, esperar que nas situações ecológicas que se aproximem das condições de clímax, seja menos provável o encontro de populações significativas de *Australorbis*, por serem tais condições as mais propícias à existência de populações luxuriantes de vertebrados por corresponderem aos biótopos de mais elevada produtividade. Recìprocamente, as situações de produtividade biológica mais reduzida, o pioneirismo primário ou secundário, com a característica incapacidade de manutenção de fauna superior luxuriante, devem estar associadas à prosperidade das ocorrências de planorbídeos. Esta última inferência corresponde a fato já assinalado por MOZLEY (1954)[6] e tem significação especial em conexão com o problema da distribuição geográfica da bilharziose mansônica, trematodiose humana cujo agente, o *Schistomosa mansoni* tem, na região neotrópica, o *Australorbis glabratus* como hospedeiro da fase larvar.

Na região neotrópica, a bilharziose mansônica não se apresenta ligada à distribuição climatérica presumìvelmente mais favorável à vida de um caramujo aquático, ou seja, às regiões mais úmidas, como a "hiléia". Pelo contrário. A "hiléia" representa um hiato separador entre a zona de incidência caribeana e a área endêmica brasileira, que abrange os Estados de clima pouco úmido, até semi-árido, do Nordeste, e se estende pela região mineira, com tendência a se expandir nas áreas de desbravamento recente do Estado do Paraná. Não obstante a ausência de endemia bilharziana, salvo a exceção muito significativa de Belterra, no Pará, o vale do Amazonas, com sua riqueza potamográfica e lacustre, e a grande variedade de suas águas internas, continua a receber contingentes imigratórios importantes dos Estados do Nordeste, justamente a área de maior incidência bilharziana no Brasil, como já recebia desde fins do século passado. Cêrca de oitenta anos de uma imigração portadora de bilharziose não foram bastantes para implantá-la em tôda a "hiléia". A causa óbvia é a ausência do caramujo capaz de servir de hospedeiro intermediário, cuja limitada ocorrência na "hiléia" foi verificada por HAAS[5] em material remetido por SIOLI, proveniente do baixo Tapajós, a área de Belterra. Foi em Belterra que surgiram os primeiros casos autóctones da doença, e, nesse local, pôde SIOLI observar a ocorrência de pequenos caramujos, identificados inicialmente sob o binômio *Tropicorbis paparyensis*, mas que LOBATO PARAENSE (informação pessoal) assegura serem indistinguíveis dos caramujos que LUTZ denominava *Planorbis centimetralis*[7, 8, 9, 10]. Belterra foi o teatro de uma tentativa de cultivo da seringueira (*Hevea brasiliensis*) pelos métodos adotados no Extremo Oriente. A floresta virgem foi arrancada, o solo desbravado e, em lugar da vegetação local, foi feita a plantação das mudas de seringueira, artificialmente regulada, com intervalos entre as plantas mantidos limpos mediante lavras contínuas. Destruída desta forma a situação ecológica natural, é óbvio que houve necessàriamente dispersão e fuga da fauna local, produzindo-se assim o vácuo biológico das terras depredadas. Com a fuga da fauna, desapareceram os portadores dos trematódeos, permitindo assim que os raríssimos exemplares de uma ocorrência desprezível de *Australorbis* pudessem pulular até atingirem valores significativos de população, e permitirem o estabelecimento da endemia bilharziana.

Esta ocorrência "hileana" da bilharziose mostra porque a região tôda continua pràticamente indene. O tipo de ocupação humana, com a economia baseada principalmente na atividade extrativa, dos produtos da floresta, ou na criação de gado sôlto nos campos nativos, não perturbou sensìvelmente a situação ecológica, tendo havido antes uma acomodação do homem, dispersado em grandes áreas, sem nenhuma concentração realmente densa, às condições naturais. Sòmente em Belterra houve tentativa de ocupação subversora da terra.

O mesmo não se pode dizer das zonas onde a endemia se estabeleceu. Não sòmente são terras de alta densidade de população humana, como são as de ocupação mais antiga, nas quais a atividade extrativa logo foi substituída pela agricultura extensiva, predatória dos solos, facultadora da erosão, exigindo desmatamento hoje pràticamente completo,

como a cultura da cana de açúcar, do tabaco, da mandioca e do milho. O resultado foi a subversão completa das condições naturais, não restando mais matas virgens, e passando a vegetação mais pujante a consistir em meros capoeirões de miserável mata secundária, onde a fauna se extingue, não havendo mais os animais descritos como abundantes nos relatos dos primeiros tempos da colonização.

A implantação da endemia bilharziana surge assim como sendo o subproduto da ocupação predatória da terra pelo homem, agravada mais recentemente com a perturbação das próprias águas internas pela criminosa prática da poluição com os resíduos industriais, tanto mais grave quanto menos caudalosos os rios, como o são todos, em regiões de pluviosidade escassa e mal distribuída como o Nordeste brasileiro.

A poluição dos rios é singularmente favorecedora da multiplicação planórbica [1]. A poluição das águas faz descer a valores próximos de zero o teor de oxigênio dissolvido, destruindo assim a fauna constituída por crustáceos, peixes e larvas de anfíbios, que vivem n'água, graças a êste oxigênio dissolvido. Com a desaparição dêste, nada sofrem os planorbídeos, respiradores do ar atmosférico, caramujos pulmonados que são. Com a supressão da fauna aquática branquiada, desaparecem as aves e todos os componentes faunísticos que às custas dela vivem. Desaparecem assim os últimos reguladores naturais das populações planórbicas que ainda sobreviviam, após a devastação da flora e fauna terrestre associada. Ademais, o enriquecimento das águas, pela poluição, em substâncias nutritivas que as adubam, permite o incremento da vegetação aquática que nutre os planorbídeos. Além de livrados dos inimigos naturais, dos portadores de trematódeos que os matam, têm em acréscimo, aumentadas as fontes de alimento. Não é, portanto, surpreendente que as zonas de plantio e industrialização da cana de açúcar, a zona das usinas e destilarias de álcool se tenham transformado em sedes da mais elevada incidência da endemia bilharziana no país, bastando para isso a manutenção de valores muito baixos de infestação dos caramujos pelas larvas do *Schistosoma mansoni*, orçando, salvo circunstâncias especiais, em tôrno de 1%.

O conhecimento das leis reguladoras da estrutura etária das biomassas permite, além da compreensão da verdadeira natureza dêste problema especial, a esperança de fornecer as bases da engenharia ecológica capaz de manter sob contrôle a bilharziose. Para tanto é necessária a realização de estudos que identifiquem os trematódeos cujas fases larvárias utilizam o *Australorbis glabratus* como hospedeiro intermediário, e se reconheçam os portadores de suas formas adultas, de maneira a permitir uma avaliação das possibilidades da utilização dêles como instrumentos de contrôle biológico. Numerosas são as formas larvárias descritas, poucas aquelas das quais se sabe alguma coisa. Das que encontramos em nossos trabalhos, sòmente de duas pudemos determinar com certeza as espécies e seus hospedeiros vertebrados. Uma, era a própria cercária do *Schistosoma mansoni*, òbviamente inútil para a finalidade desejada. A outra consistia nas rédias e cistocercárias do *Halipegus dubius*, parasito da cavidade oral e faringe do *Leptodactylus occelatus*, uma das rãs que sucumbem, em sua fase de girino, à poluição das águas.

Acreditamos no advento de uma engenharia ecológica do complexo de interatuações envolvendo o homem e suas atividades econômicas, os equilíbrios ecológicos da fauna e flora, terrestres e aquáticas, no sentido de se obter a harmonia entre a ocupação econômica eficiente e a conservação dos equilíbrios naturais desfavoráveis ao hospedeiro intermediário e ao subproduto funesto da prosperidade dêste — a endemia bilharziana. Não acreditamos no bom resultado nem na razoabilidade das tentativas de contrôle planorbiano mediante o uso de substâncias planorbicidas. Não sòmente têm-se revelado pouco eficientes; de aplicação difícil, em muitos tipos de ocorrência; dispendiosas, considerada a extensão, volume e número das águas a tratar e, sobretudo, especialmente no caso dos pentaclorofenatos, porque são consideràvelmente mais letais para peixes, que importaria incrementar, em vez de destruir, como fontes que são, de proteínas alimentares de alto valor fisiológico, em re-

giões de gente subalimentada e pobre, e de contribuírem para a manutenção da fauna portadora dos parasitos controladores das populações planórbicas na natureza. O planorbicida, antes de ser um benefício, é, pelo menos os conhecidos até agora, um fator a mais de poluição das águas. Seu uso importa no infringimento das prudentes legislações protetoras da riqueza natural que representam as águas internas, e não tem cabimento agravarem-se situações já de si deploráveis e requerendo correção. Julgamos mal empregados o esfôrço e a pecúnia dispendidos largamente em investigações evidentemente pouco promissoras, enquanto pouco se procura fazer no domínio da ecologia aplicada a êste problema, caminho no qual apenas julgamos ter esboçado os primeiros passos hesitantes.

SUMMARY

Theory of static biomasses subject to parasitary action: ecology of the mansonic bilharziosis nosologic complex.

The Authors demonstrate the consequences of the modifications of biotope elements on biomasses.

Variation of one or more of the parameters will cause the biomass value to be altered, the alterations depending on the intensity of variation.

This modification will reflect upon the number of individuals, the age structure and even the measurable characteristics. when proportional to life span.

Transferring these concepts to the study of planorbid mollusca, vectors of mansonic bilharziosis, the authors conclude that there is a correlation of inverse proportionality between the maximum size attained in a population of the same species, measured at the widest diameter of the shell, and the relative (percentual) frequency of the infestation of mollusca by trematode larvae.

REFERÊNCIAS

1. COUTINHO, A. B. — Os cursos d'água e os resíduos industriais. Recife, Codepe, 1954.

2. COUTINHO, A. B.; COUCEIRO, R. de O.; BARBOSA, A. M. de S.; FREITAS, G. G. de & RAMOS, H. — Taxonomia e genética no gênero *Australorbis*. An. Fac. Med. Univ. Recife **17**:35-38, 1957.

3. COUTINHO, A. B.; GOUVÊA, L. & LUCENA, D. — Investigações em torno da epidemiologia da esquistossomose mansonica em Pontesinha e Victoria, Estado de Pernambuco, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **35**:207-230, 1940.

4. COUTINHO, A. B.; SCHACHNIK, J.; COUCEIRO, R. de O.; FREITAS, G. G. de & BARBOSA, A. M. de S. — Investigações sôbre a ecologia do *Australorbis glabratus*. An. Fac. Med. Univ. Recife **14**:233-245, 1954.

5. HAAS, E. — Arch. f. Molluskenk. **78**:149-156, 1949.

6. MOZLEY, A. — An introduction to molluscan ecology. London, Lewis, 1954.

7. SIOLI, H. — Alguns resultados e problemas da limnologia amazônica. Bol. técn. Inst. agron. Norte (24):3-44, 1951.

8. SIOLI, H. — Estudo preliminar das relações entre a geologia e a limnologia da Zona Bragantina, Pará. Bol. técn. Inst. agron. Norte (24):67-76, 1951.

9. SIOLI, H. — Schistosomiasis and limnology in Amazon Region. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 2:700-707, 1953.

10. SIOLI, H. — Sôbre a sedimentação na várzea do Baixo Amazonas. Bol. técn. Inst. agron. Norte (24):45-65, 1951.

Recebido para publicação em 21 agôsto 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(5):230-238, setembro-outubro 1961

CDU 593.191
:595.771

A GREGARINE, *MONOCYSTIS CHAGASI* n. sp., OF *PHLEBOTOMUS LONGIPALPIS*. REMARKS ON THE ACCESSORY GLANDS OF *P. LONGIPALPIS*

S. Adler [1] and Wilson Mayrink [2]

SUMMARY

A gregarine of the genus *Monocystis* is recorded from the sandfly *Phlebotomus longipalpis*, male and female, wild and laboratory bred.

Oocysts were observed in the accessory glands in 20 per cent of all infections in females. They are injected into the lumen of the accessory glands by mature cysts attached to the glands. They are discharged from the glands by repeated contractions of the latter.

During oviposition eggs are exposed to the secretion of the accessory glands. This secretion sets and forms a layer on the surface of the egg which protects them against invasion by micro-organisms.

During oviposition the surface of eggs becomes contaminated with oocysts discharged from infected glands; these oocysts are glued to the surface of the eggs by the secretion of the glands. Larvae emerging from contaminated eggs are thus exposed to infection.

The name *Monocystis chagasi* is suggested for the gregarine of *Phlebotomus longipalpis*.

INTRODUCTION

During routine dissections of sandflies caught in Lapinha near Belo Horizonte, Minas Gerais, we found 10% of specimens of *P. longipalpis* infected with a gregarine of the genus *Monocystis*. This gregarine would call for no special attention beyond the fact that it is a parasite of *P. longipalpis*, the vector of visceral leishmaniasis in Brazil, were it not for an interesting adaptation, *viz.* infection of the accessory glands with oocysts and, as a consequence, contamination of the surface of eggs during oviposition. We found no gregarines in other species of *Phlebotomus* caught in Lapinha (*P. renei, P. migonei, P. quinquifer, P. pessoai*). The parasite was also found in laboratory bred male and female *P. longipalpis* (from 20% to 80% in various batches). The relatively dense population bred under laboratory conditions obviously favour a higher infection rate than that found in nature because of the increased opportunities for larval infection. The gregarine is not pathogenic and the heaviest infections (up to 80 gregarines per sandfly) did not interfere with egg development or oviposition.

The smallest gregarines seen in adult sandflies were 32 μ in size and were round, oval or pear shaped. Larger parasites were round or oval. There is a narrow clear rim between the wall and the endoplasm. The latter contains brownish granules, which are smaller, darker and more densely packed in the larger and more mature specimens than in the smaller ones. The granules are basophilic in Giemsa stained preparations. In individuals up to 60 μ in diameter a blunt

(1) Department of Parasitology, The Hebrew University, Jerusalem.
(2) Centro de Pesquisas de Belo Horizonte, Departamento Nacional de Endemias Rurais, Brasil.

conical proboscis-like projection about 10 μ at its base, containing clear agranular ectoplasma, is occasionally seen. This structure which projects and retracts very slowly was suspected to act as an organellum of attachment although active attachment to tissue was not observed.

The nucleus attains a size of 28 μ in the largest adults and contains a relatively large nucleolus (8 to 10 μ in diameter). The majority of mature adults (Plate 1, Fig. 1), *i.e.*, individuals capable of participating in pseudoconjugation, vary in size between 72 μ and 108 μ, but a few exceptional individuals attain a size of 120 μ.

Pseudoconjugation begins by contact between two adults; the point of contacts becomes flattened and the area of contact extends till the two pseudoconjugants are separated by a straight narrow partition continuous with the outer wall of both participants. The partition dissolves and the two pseudoconjugants are enclosed in a common gametocyst (Plate 1, Fig. 2) which varies from 72 μ to 108 μ in diameter but, as in the case of the adult exceptional individuals, attain 120 μ. Two small indents between the wall and the outer border of the endoplasma may be seen at opposite sides of the gametocyst; one of them is probably the site of rupture of the cyst wall during the liberation of oocysts.

Nuclear division is not always synchronous in the two individual conjugants; there may be a considerable number of nuclei (16 or more) in one, before nuclear division has commenced in the other. Observations on the course of development of the gametocyst in laboratory-bred sandflies indicate that nuclear multiplication proceeds for one to two days before production of gametes which conjugate and form zygotes. The latter grow and become elliptical or spindle-shaped (10.0 μ-11.9 $\mu \times 5.8$ μ when fully grown) with a nucleus 4 μ in diameter. The nucleolus is relatively large (2 μ in diameter) and the protoplasm contains grayish lipid granules. Occasionally fully grown zygotes which are triangular in shape are found (Plate 1, Fig. 4); this accounts for the rare triangular oocysts found in heavy infections. Each fully grown zygote secretes a tightly fitting shell and becomes a biconical symmetrical oocyst (10.9 μ-11.9 $\mu \times 5.8$ μ) with a small projection at each extremity (Plate 1, Fig. 5; Plate 3, Figs. 1 and 2). The nucleus of the oocyst in the mononuclear stage is 4 μ to 5 μ in diameter and contains a relatively large nucleolus, up to 2 μ in diameter; chromatin is distributed in small masses on and near the nuclear wall. A relatively large nucleolus is characteristic of this gregarine in all its developmental stages.

The large majority of oocysts found in the lumen of the accessory glands or free in the abdominal cavity were uninucleate. Nuclear division (up to three corresponding to 8 sporozoites) occurred in some oocysts after 24 hours in a moist chamber but many oocysts remained uninucleate even after three days.

Prior to the development of oocysts the gametocyst is resistant to pressure and considerable force is necessary to rupture its wall. With the appearance of the oocysts, the consistency of the gametocyst wall changes, the internal pressure rises and the wall ruptures under the slightest external pressure, liberating oocysts through one aperture. During this process the outer cyst wall shrinks rapidly without folding and finally assumes the shape of a horse-shoe with an aperture at the narrow end (Plate 2, Fig. 4). The inner wall of this structure is corrugated and encloses a patchy matrix often containing residual oocysts, but the brown granules characteristic of the previous stages are absent. This structure is very characteristic and may well be mistaken for tissue of the host, particularly when residual oocysts are absent, but its origin and mode of formation from a cyst which has liberated oocysts is quite clear. In fresh dissections this typical structure is found either free or attached by its narrow end to the wall of an accessory gland and in some instances its lumen appears to be continuous with that of the gland. The above structures were found only in females which contained oocysts free in the haemocele or in the lumen of the accessory glands, or both.

The oocysts are not resistant to desiccation; after drying in air on a slide, one side collapses and the contents shrink.

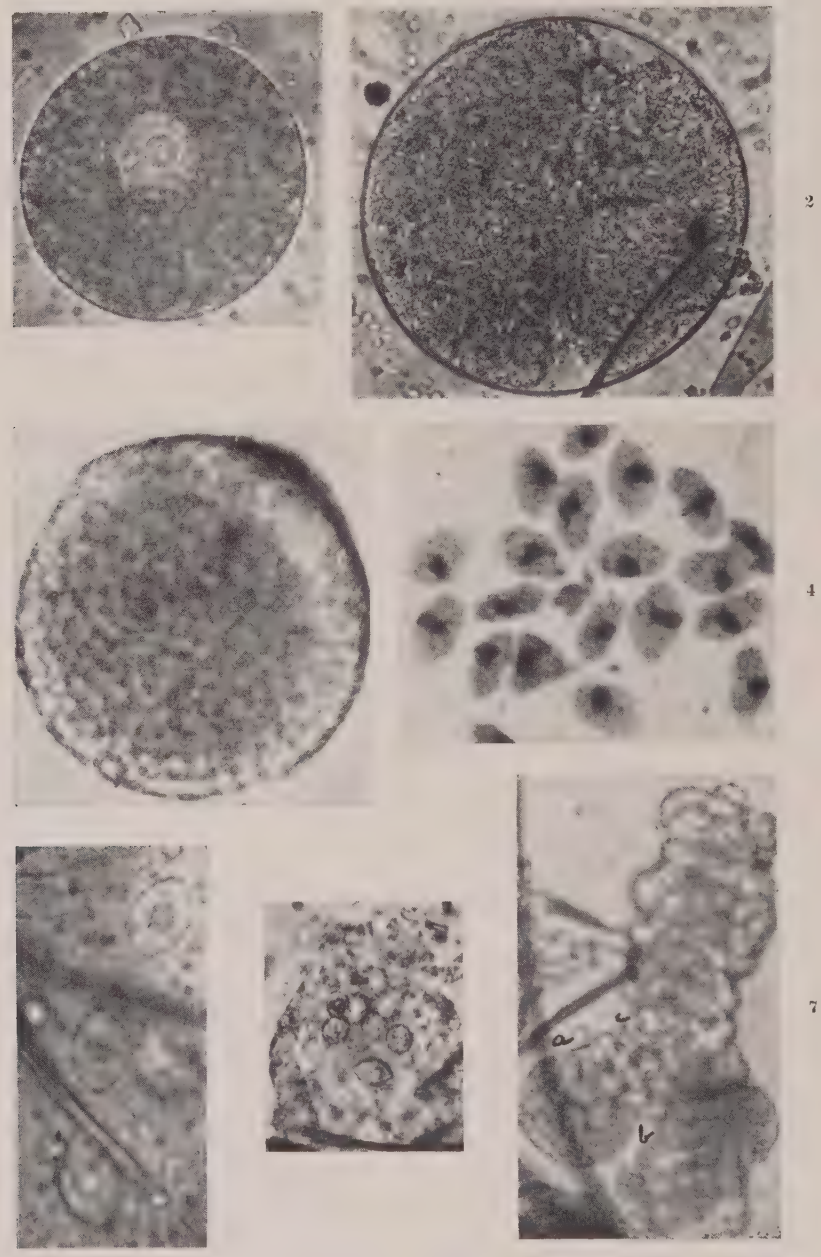

PLATE 1.

1. Adult Gregarine. Fresh preparation ×500.
2. Pseudo-conjugation. Fresh preparation ×500.
3. Gametocyst containing fully grown zygotes ×500.
4. Fully grown zygotes. One zygote is triangular. Giemsa stain ×1,300.
5. Oocysts in uninucleate stage. Fresh preparation ×1,300.
6. Part of accessory gland containing residual oocysts. Fresh preparation ×500.
7. Accessory gland with appearance of herniation. (a) Cyst which has ruptured and discharged its oocysts into the lumen of an accessory gland. (b) The wall of the gland is continued on to that of the cyst. (c) An oocyst at junction of cyst and gland. Fresh preparation ×300.

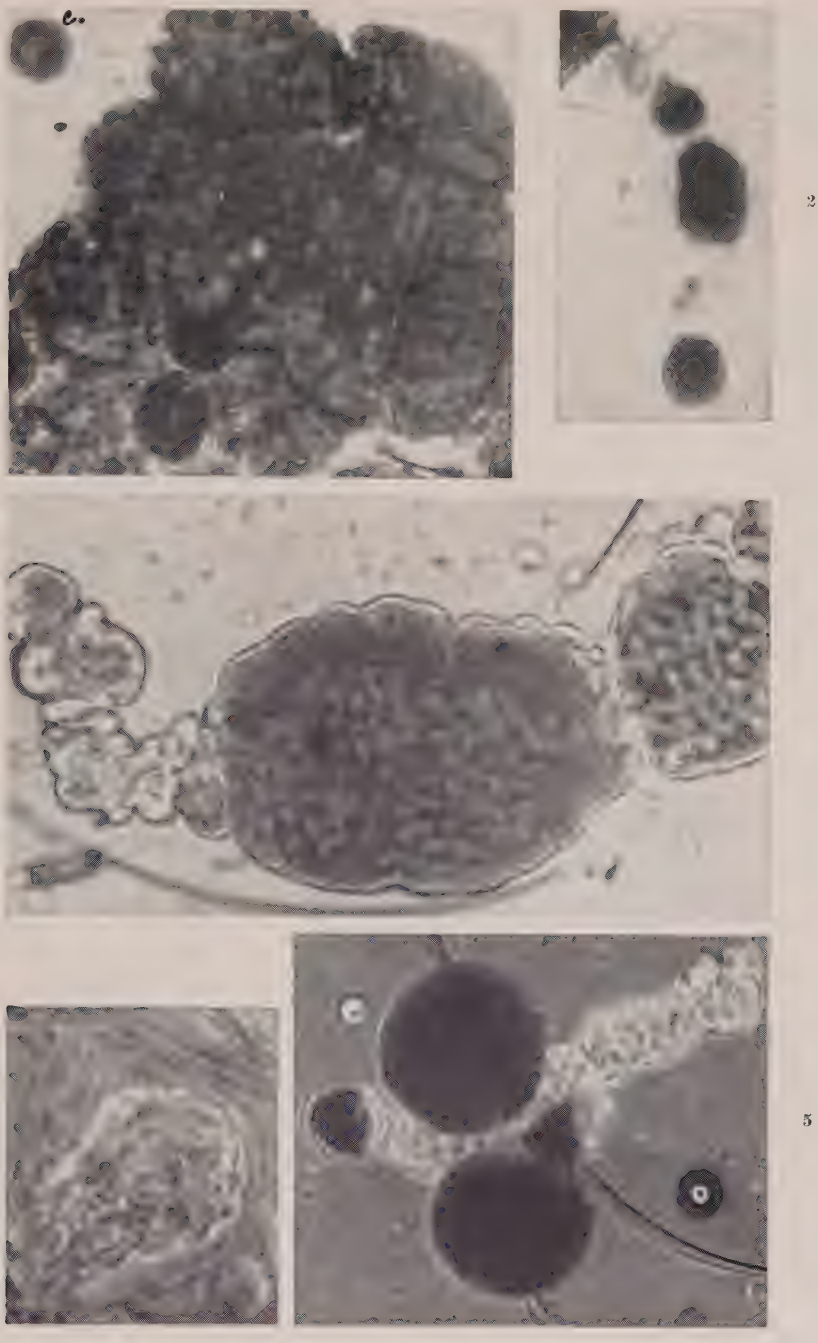

PLATE 2.

1. Part of ovary of *P. longipalpis*. (a), (b) Two gametocysts lying among ova. (c) An adult gregarine lying outside the ovary. Fresh preparation (2 days in ice chest before photography) ×200.
2. Fresh dissection of an active accessory gland showing dilated and constricted parts. This gland contained numerous oocysts ×200.
3. Portion of same gland showing numerous oocysts in the lumen ×650.
4. Remnants of a cyst which has discharged oocysts. Note corrugated inner wall ×700.
5. Part of an accessory gland with two gametocysts lying on its surface. The upper cyst contained zygotes. Fresh dissection ×300.

Both pseudo-conjugation and gametocysts containing zygotes were found in laboratory-bred sandflies two to four days after a blood meal. The above data apparently represent the shortest time necessary for the completion of the sexual cycle but the development of individuals in a single sandfly is not synchronous. It is not unusual to find parasites of all sizes from 32 μ upwards and fully developed cysts containing oocysts in the same sandfly.

It is interesting to note that we did not see pseudo-conjugation or any subsequent part of the sexual cycle, in infected laboratory-bred males, although gametocytes up to 80 μ in diameter were found and some infections were relatively heavy (20 to 40 parasites in the abdominal cavity). This may be due to the fact that the life span of laboratory-bred males is too short to include the sexual cycle of the gregarine.

The shortest time required for the maturation of sandfly ova approximates to that required for the development of oocysts of the gregarine, but the two events do not always coincide. We noted instances of oviposition by heavily infected females in which the most advanced cysts had not discharged oocysts. On the other hand we found oocysts in both accessory glands in a female in which the ova had only attained a length of 140 μ, *i.e.*, one to two days before maturation. These discrepancies may be due to variations in the interval between hatching and the opportunity for the first blood meal without which ova of *P. longipalpis* cannot attain full development, and to variations in the opportunities for pseudo-conjugation between mature gametocytes.

The above brief description indicates that the life cycle of the gregarine of *P. longipalpis* conforms to that of *Monocystis* sp. in general and resembles that of *Monocystis mackiei* in *P. argentipes* as described by SHORTT & SWAMINATH (1927). There are, however, some differences between *Monocystis mackiei* and the gregarine of *P. longipalpis*. The gametocytes of *P. mackiei* are 166.0 $\mu \times 66.3$ μ; those found in *P. longipalpis* are 72 μ to 108 μ in diameter though rare individuals attain a size of 120 μ. In *P. mackiei* adults are found in the pupae of *P. argentipes;* in *P. longipalpis* full development of the gametocyte from 32 μ to full size occurs in the adult sandfly (we did not study the course of development in larvae or pupae). The nucleus of the adult *M. mackiei* is slightly larger (30 μ) than in our material (28 μ). The oocysts of *P. mackiei* are 9.8 $\mu \times 5.8$ μ in size, those in our material are 10.9 to 11.9 $\mu \times 5.8$ μ. Infections of *P. argentipes* with *P. mackiei* were much heavier than in *P. longipalpis*, in which the number of parasites in an infected sandfly ranged between 1 and 80, and in most cases was less than 20. *P. mackiei* invades all parts of the sandfly (head, thorax, abdomen, legs) but parasites were not recorded from the accessory glands; in our material the parasites were found in the abdominal cavity, accessory glands and occasionally in the ovaries. A solitary adult was found only on one occasion in the thorax of a male sandfly, but no gregarines were found in the head. The accessory glands (one or both) were infested with oocysts in 20% of all individuals. This figure should be considered as an underestimate of the potential infection rate in accessory glands which are never infected before the cycle of the gregarine has advanced to the formation of oocysts.

We propose the name *Monocystis shagasi* for the above described gregarine of *P. longipalpis.*

The surface of the eggs deposited by a wild sandfly *P. longipalpis* was found to be contaminated with firmly adhering oocysts and we observed this condition (Plate 3, Figs. 1 and 2) in the eggs of infected laboratory-bred sandflies; in the latter the number of oocysts per egg varied from 1 to 50. In one batch of eggs from a single female the number of oocysts per egg varied from 1 to 10 and some eggs apparently escaped contamination. In another batch they were arranged in rows of 8 to 10 at right angles to the long axis of the egg. The eggs were examined from almost immediately after oviposition up to 6 days later, and no differences were noted in the distribution and number of oocysts attached to their surface. (It is interesting to note that the optical properties of the shell permit observation of the developing embryo in intact egg of *P. longipalpis.*)

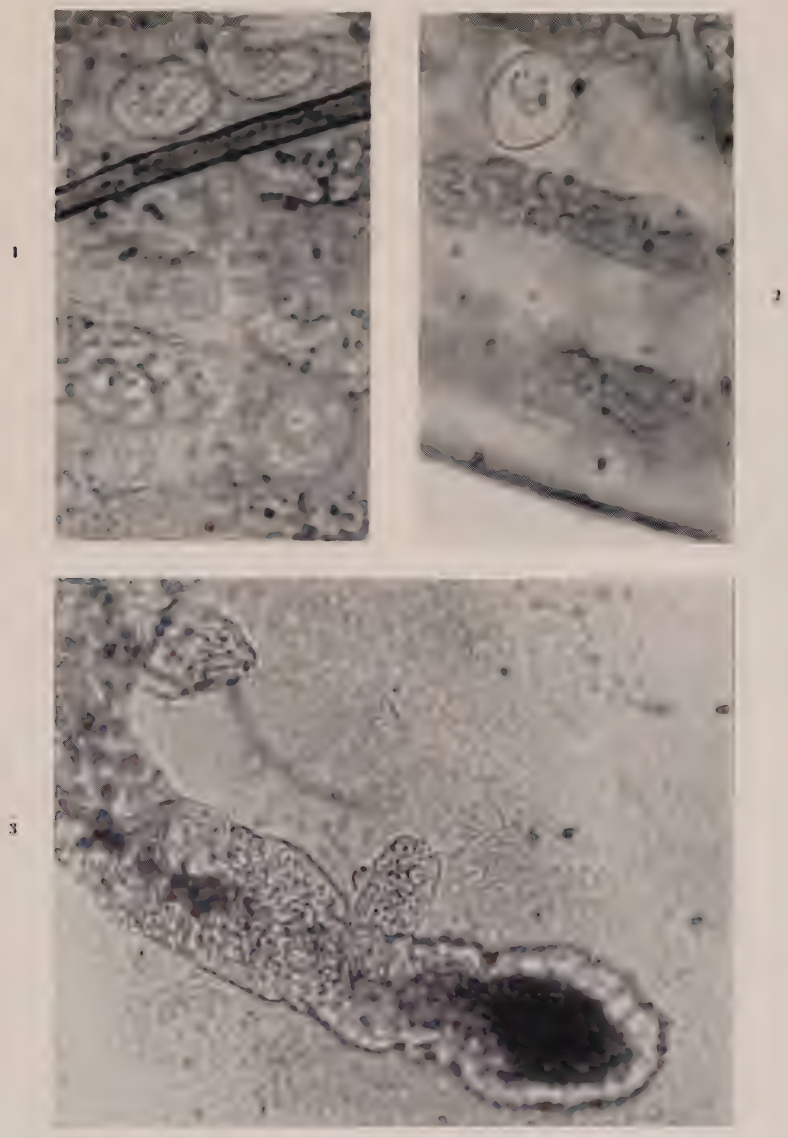

PLATE 3.

1 and 2. Oocysts of *Monocystis chagasi* on the surface of eggs of *P. longipalpis* ×1,300.
3. Part of an accessory gland of wild sandfly *P. longipalpis*. Two cysts which have discharged their oocysts are attached to the gland. Fresh dissection ×300. The dark areas at the apex and near centre of the gland contain granules secreted by the gland.

Five instances were found, four in laboratory-bred sandflies and one in a wild sandfly, in which oocysts were restricted entirely to the lumen of the accessory glands, *i.e.*, none were free in the abdomen. In two of the above sandflies no stages of the parasite were seen apart from oocysts in the accessory glands; in one the infection was heavy and in the other we found only 20 to 30 oocysts, apparently the residues of a population the majority of which had been discharged through the genital aperture. A dissection of this sandfly revealed three typical structures which were obviously residues of

gametocytes which had discharged their oocysts. These structures which contained no residual oocysts were attached to an accessory gland. The abdomen of this sandfly was full of almost mature eggs.

In two other of the above five sandflies, the abdomen contained adults, pseudo-conjugants, and gametocytes with zygotes but no oocysts in their interior. The fifth sandfly will be discussed later in some detail because it illustrated the mechanism whereby oocysts are introduced into the accessory glands.

We were at first puzzled by the relatively frequent infestation of one or both accessory glands with oocysts, particularly as we found no pseudo-conjugation and no gametocytes in the lumen of the accessory glands in more than 700 dissecations and it was also clear that oocysts could not enter a gland by their own efforts. This point was cleared up by a study of the accessory glands of *P. longipalpis*, and the behaviour of gametocysts of *M. chagasi* in relation to these glands.

In newborn laboratory-bred females the accessory glands are grayish-white in color and contain no granules in their lumen. After a blood meal granules together with a dark brown fluid appear in the lumen.

It may be noted that wild sandflies *P. longipalpis, P. renei, P. quinquifer, P. migonei, P. pessoai* and *P. cavernicolus* without a trace of a blood meal in the alimentary tract are of two types, one without and the other with granules in the lumen of the accessory glands. The former are therefore considered to be recently hatched specimens which have not yet taken their first blood meal, and the latter are considered to be individuals which have previously taken a blood meal, developed mature ova, oviposited, and emerged for a refeed after complete digestion of the previous blood meal.

In females sacrificed at any stage of their life the glands are found to be mechanically active; segments contract and dilate slowly and repeatedly while the adjacent part may be constricted until its lumen is almost obliterated (Plate 2, Fig. 2). The movements in the ative segment create a slow current first in one and then in the opposite direction and as a result its contents are churned and homogenised. Different segments become active and their contents hemogenised at various times.

In their passage through the vagina, during oviposition, eggs are exposed to the secretion of the active accessory glands and are simultaneously brought into contact with oocysts discharged from infected glands. The secretion of the glands sets quickly and thus glues oocysts on to the surface of contaminated eggs.

The secretion of the glands is essential for the protection of the developing embryo; out of 200 fully grown apparently mature eggs removed from the abdomen by dissection and therefore not exposed to the secretion of the glands, the interior of the large majority became infected with fungi, yeasts or bacteria after being kept on moist filter paper for a few days. The thin layer on the surface of the egg contributed by the accessory glands serves as an impenetrable barried against invasion of the interior of the egg by micro-organisms.

The accessory glands like the ovaries and hindgut continue to contracts and dilate up to thirty hours after the death of the sandfly if the latter is protected from drying by being placed in saline. (The heart continues beating up to 90 times a minute for several hours after death.)

A network of fine fibrils continuous with the boundary of each ovary divides the latter into compartments each containing an ovum and its respective nurse cells. This system of fibrils and the terminal filament of each ovary contract and relax continuously, thereby causing slight changes in shape and a slow agitation of the contents of the ova until they are at least 140 μ in length. The nurse cells are also affected by the abovementioned movements of the ovaries and in addition change their shape spontaneously. *P. longipalpis* usually deposits all its mature eggs in a single laying but occasionally one or a few mature ova remain in the abdomen; in such cases one or both of the new ovaries grow round and include the residual mature ova.

We found three cases of infestation of ovaries with the gregarine. In one instance an adult gregarine lying in an ovary became

slightly deformed and displaced with every contraction of the organ from which it was eventually expelled. In two other instances several gametocysts were lying among developing ova almost half the size of mature ones (Plate 2, Fig. 1).

P. longipalpis is occasionally infected with a parasitic fungus and it is interesting that even heavy infestation of the ovaries do not affect the movements of the fibrils but may cause premature oviposition. A moribund sandfly deposited eggs which were considerably smaller than normal. Dissection revealed that both ovaries were heavily infected with fungus.

Gametocysts in an advanced stage of development were frequently found continuous with the accessory glands (Plate 2, Fig. 5) and cases were noted in which the outer border of the gland was intimately connected with a part of the wall of one or more cysts. We do not know whether this relationship is established directly by the previously mentioned transient conical projection from the gregarine or by the adhesion of mature cysts to the wall of the gland.

During the dissection of a laboratory-bred sandfly (the last of the above-mentioned five in which oocysts were restricted to the accessory glands), fed three days previously on a guinea pig, we observed the inoculation of oocysts from a fully developed cyst into an accessory gland to which it was attached. The cyst contracted and injected oocysts into the lumen of the gland through a breach at the point of union between the two. After inoculating hundreds of oocysts into the lumen of the gland the cyst shrank and became transformed into the typical horse-hoe-shaped structure previously described. A few minutes later the shrunken cyst still containing residual oocysts turned upwards and lay on the upper surface of the gland to which it was still attached by its narrow end. During the whole of this process, segments of the glands were contracting and dilating and numerous oocysts were pouring out through the vagina. The hindgut and the soft tissue enclosing the spermathecae and their ducts were also actively contracting and dilating. It was easy to follow the whole process in this dissection because the infection in the sandfly was relatively mild and, apart from the abovementioned cyst, only a solitary adult 80 μ in diameter was found lying in the abdomen. The source of the oocysts and the mechanism of their introduction into the accessory glands were quite obvious in this case, and this mechanism is probably responsible for all cases of infestation of the glands with oocysts. Structures typical of cysts which have liberated their oocysts remain attached to the accessory glands for some time (Plate 3, Fig. 2) but they eventually separate and may infected glands are found without them. While attached to the gland they may produce the impression of a hernia and in one case (Plate 1, Fig. 7) we found what appeared to be definite herniation of a gland, the wall of the cyst forming the distal part of the hernia. The lumen of the gland in this particular case was continuous with the cavity of the cyst which contained residual oocysts. The other accessory gland of the same sandfly (Plate 2, Figs. 2 and 3) contained numerous oocysts but no residues of gametocysts were found on its surface.

Gregarines in advanced stages of development tend to be deposited in the hindmost part of the abdomen and the most mature cysts are therefore brought into close proximity with the hindgut, rectum, spermathecae and accessory glands. We found no instances of attachment of cysts to the wall of the hindgut or to any object apart from the walls of one or both accessory glands. Oocysts were found either free in the abdominal cavity or inside the lumen of the accessory glands or both, and nowhere else, except for occasional contaminations of the inner surface of the terminalia to which they were glued by the secretion of the accessory glands. The fact that oocysts may be restricted to accessory glands even in mild infections indicates a predilection on the part of gametocysts for attachment to the wall of the glands. We know of no other instance in the genus *Phlebotomus* of infestation of the accessory glands with a parasite.

Infestation of the haemocele with oocysts may be sufficient for perpetuating the gregarine through chance ingestion of oocysts by larvae feeding on the carcasses of infected females. The opportunities for this type of infection are obviously greater under condi-

tions of laboratory breeding than in nature and the infection rates in laboratory-bred sandflies, *P. argentipes* and *P. longipalpis* are accordingly much higher than those found in nature, but the probability of infecting the offspring of an infected female in nature by this method is obviously less than in the case of infestation of the accessory glands. Oocysts lying free in the abdominal cavity may well mingle with mature eggs as noted by SHORTT & SWAMINATH in the case of *M. marckiei*. We did not however observe the passage of oocysts directly from the haematocele to the oviduct in our material. This point requires further investigation.

The injection of oocysts into the accessory glands, their expulsion from the glands by the contraction of the latter, the contamination of eggs with oocysts glued to their surface by the secretion of the glands, and the consequent opportunity of infecting the emerging larvae, altogether constitute an efficient mechanism for the perpetuation of *Monocystis chagasi* in spite of the fact that oviposition and dicharge of oocysts from the gland are not always synchronous. This mode of dissemination which does not necessarily involve the death of the sandfly *P. longipalpis* since the latter frequently survives oviposition, is the only one possible in those cases where oocysts are restricted to the accessory glands.

RESUMO

Sôbre uma gregarina, "Monocystis chagasi" n. sp., de "Phlebotomus longipalpis". Notas sôbre as glândulas acessórias de "P. longipalpis".

Os autores encontraram e descrevem uma gregarina do gênero *Monocystis* em machos e fêmeas de *Phlebotomus longipalpis* (Diptera, Psychodidae), apanhados na natureza ou criados em laboratório.

Verificaram a presença de oocistos nas glândulas acessórias de 20% das infecções nas fêmeas; êles são injetados no lume das glândulas acessórias por cistos maduros prêsos às referidas glândulas e são eliminados destas por contrações repetidas das mesmas.

Durante a ovoposição os ovos são revestidos pela secreção das glândulas acessórias, que forma uma camada protetora contra a invasão de microorganismos.

Por ocasião da postura a superfície dos ovos contamina-se com oocistos eliminados das glândulas infectadas e que poderão contaminar as larvas quando da sua eclosão.

A gregarina do *P. longipalpis* é considerada uma nova espécie, para a qual os autores propõem o nome de *Monocystis chagasi*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Mr. Alberto Falcão and Mrs. Alda Falcão for valuable help in collecting wild sandflies and breeding *P. longipalpis* in the laboratory.

We have to thank Prof. G. Schreiber for the microphotographs.

REFERENCES

SHORTT, H. & SWAMINATH, C. S. — *Monocystis mackiei* n. sp. parasitic on *Phlebotomus argentipes* Ann. and Brun. Indian J. med. Res. **15**:539-553, 1927.

Recebido para publicação em 16 agôsto 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(5):239-253, setembro-outubro 1961

CDU 616.995.122-091

REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE EM MACACOS *CEBUS* INFESTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI* *

Ageu Magalhães Filho

RESUMO

Uma breve revisão bibliográfica demonstrou que as manifestações de resistência adquirida por animais de experiência após uma ou numerosas infestações com *schistosomas* caracterizam um mecanismo imuno-alérgico e que êste estado de imunidade relativa ou premunição está relacionado com a absorção de substâncias resultantes da destruição dos parasitos e seus ovos no organismo do hospedeiro.

Promovendo múltiplas infestações com *Schistosoma mansoni* em quatro macacos *Cebus* sp., o autor concluiu que uma reinfestação com intervalo de vinte e quatro dias da primoinfestação não determinou reações de hipersensibilidade; que animais infestados e reinfestados depois de um intervalo de um e dois anos, apresentaram reações contra a última infestação, produzindo-se lesões graves pulmonares e renais que caracterizam um estado de hipersensibilidade e que provocaram a morte dos animais.

INTRODUÇÃO

O problema das reações de hipersensibilidade, observadas em indivíduos portadores de esquistossomose, tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores.

Comumente são descritas manifestações alérgicas em pacientes no curso de uma parasitose; outras vêzes, porém, quadros mais graves, caracterizados por febre, dores generalizadas, tosse com expectoração muco-sangüinolenta, intensa prostração, tonturas, cefaléia e acentuada eosinofilia periférica são observadas em seguida a uma infestação. Êste quadro clínico tem recebido a designação de "estádio septicêmico" ou larvário ou ainda de "fase toxêmica" da doença (Marques [12]).

Numa breve revisão bibliográfica do assunto verifica-se que numerosas investigações em animais têm demonstrado que, uma vez infestado, passa o hospedeiro a oferecer reação contra a invasão por novos parasitos. Uma reação celular definida contra cercárias invasoras, na pele de animais "imunes" com esquistossomose, foi obtida por Watarai [20], Olivier & Weinstein [14], Kagan & Meranze [8], Stirewalt [17] e Magalhães Filho & Coelho [11].

Os resultados obtidos por Fairley [5], Olivier & Schneiderman [15], Vogel & Minning [18] e Magalhães Filho [10], demonstraram também haver uma alta mortalidade de esquistossômulos quando êstes atravessam os pulmões.

Instituto Nacional de Endemias Rurais do D.N.E.Ru. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brasil.

* Êste trabalho obteve o Prêmio "Carlos Chagas" do Instituto de Medicina Tropical da Universidade do Recife.

Estas reações são provàvelmente provocadas pela presença de antígenos produzidos no corpo do hospedeiro em conseqüência da destruição de ovos e de parasitos nos seus tecidos, os quais, circulando no sangue, condicionam o estado comumente chamado de "imuno-alérgico". Os anticorpos formados para êsses antígenos dão lugar a reações de diagnóstico (cutirreação). Êste fato levou a maioria dos pesquisadores a acreditar na possibilidade de uma imunização ativa contra novas infestações.

Uma série de trabalhos tem demonstrado que existe um estado de imunidade relativa, isto é, parcial, e que desaparece com a cura da parasitose (CULBERTSON [2]). Tai estado foi chado de "premunição" por SERGENT [16].

São, portanto, manifestações de uma resistência adquirida pelos animais de experiência após uma ou numerosas reinfestações. Em alguns casos têm sido observados fenômenos de hiperergia, como foi o caso dos macacos reinfestados por VOGEL & MINNING [18], nos quais foi observado o fenômeno de Arthus.

Para que se estabeleçam sensibilidade e resistência é necessário que a infestação tenha amadurecido, isto é, que os parasitos tenham atingido o estado adulto e iniciado a oviposição (40 dias aproximadamente), segundo opinião unânime dos pesquisadores sôbre o assunto.

Por outro lado, KAGAN & LEE apud [15], assinalam que, matando todos os parasitos, por tratamento, removeram a resistência adquirida em roedores.

Reações cutâneas, reações de fixação de complemento e outras reações entre o sôro do hospedeiro e cercárias têm sido obtidas em animais infestados com *schistosomas*; isto, todavia, não é argumento para que se admita que estas reações estejam definitivamente relacionadas ao mecanismo de resistência (NEWSOME [13]).

A presente experiência foi realizada com o objetivo de analisar os fenômenos imunoalérgicos que se desenvolvem em animais suscetíveis à esquistossomose mansoni, quando submetidos a reinfestações.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 4 macacos *Cebus* sp. oriundos da Amazônia, aparentemente sadios, com pêso variando entre 4.100 g e 5.000 g, todos do sexo masculino.

Os animais foram colocados, separadamente, no biotério, onde permaneceram por vários dias em observação, após o que, foram infestados.

Em vista da dificuldade em se conterem os animais a fim de proceder às infestações, resolvemos utilizar cubas rasas de vidro, cheias d'água infestada com cercárias de *Schistosoma mansoni*. Grãos de milho foram postos dentro da água a fim de atrair os animais.

A técnica foi empregada com ótimo resultado, pois os animais, ávidos pelo milho, permaneceram, durante várias horas, com as patas dentro das cubas infestadas.

Em cada cuba foram colocadas 1.000 cercárias, de modo que os animais foram infestados com número aproximadamente igual.

As cercárias de *Schistosoma mansoni* foram obtidas de *Australorbis glabratus* com infestação natural e capturados em região endêmica (Paulista, PE). Dos quatro animais infestados, três foram reinfestados, sendo o primeiro uma vez, o segundo duas e o terceiro três vêzes (v. quadro). O primeiro macaco, depois de 24 dias da primoinfestação, foi reinfestado com uma dose de aproximadamente 10.000 cercárias, tendo morrido por acidente (o animal escapou da gaiola, e durante sua captura caiu de uma árvore, morrendo em seguida) no 24.º dia após a reinfestação.

QUADRO

Macaco nº	Intervalo de tempo entre infestações (dias)			Intervalo de tempo entre a última infestação e a morte (dias)
	1ª e 2ª	2ª e 3ª	3ª e 4ª	
1	24	—	—	24
2	24	365	—	6
3	730	2	30	7
4	—	—	—	365

O segundo animal, do mesmo modo, foi reinfestado 24 dias depois, sendo empregada uma dose menor de cercárias, aproximadamente 3.000. Tendo sobrevivido em boas condições, foi novamente infestado um ano após, desta vez com uma dose elevada (10.000 cercárias); sua morte ocorreu 6 dias após esta última reinfestação.

O terceiro animal foi reinfestado 2 anos depois da primoinfestação, com dose elevada (10.000 cercárias) e novamente dois dias depois foi exposto a dose igual de cercárias. Como não apresentasse alterações, aos 30 dias da segunda reinfestação, foi infestado pela terceira vez com a dose de 10.000 cercárias. Sua morte ocorreu 7 dias depois.

Com exceção do macaco n.º 1, que foi infestado e morreu em curto intervalo, todos os outros animais eliminaram constantemente ovos viáveis nas fezes. Os exames coprológicos eram realizados semanalmente, pelo método direto.

O macaco n.º 4, que foi apenas primoinfestado, permaneceu em boas condições, eliminando regular quantidade de ovos nas fezes, tendo sido sacrificado um ano depois, a fim de servir como testemunha.

Todos os animais foram necropsiados logo em seguida à morte, tendo-se usado as seguintes colorações para o estudo histológico: hematoxilina-eosina, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, tricrômico de Masson e impregnação pelo método de Perdrau.

RESULTADOS

Macaco n.º 1

Foram observadas, ao exame necroscópico, as seguintes alterações:

Pulmões congestionados com áreas hemorrágicas na superfície pleural; traquéia e brônquios apresentam material de aspecto mucopurulento; a consistência do parênquima está um pouco aumentada; gânglios linfáticos volumosos no mediastino.

Fígado apresenta cápsula distendida e superfície castanho-arroxeada intensa, mostrando ao corte o parênquima levemente congestionado.

O baço apresenta cápsula normal; ao corte, a polpa vermelha congestionada e folículos inaparentes; gânglios mesentéricos mostram-se levemente aumentados de volume.

Demais órgãos não apresentam anormalidade aparente. Foram realizados cortes de todos os órgãos para estudo histológico.

Ao exame microscópico os pulmões apresentaram-se com vasos sangüíneos de um modo geral congestos. Capilares septais al-

veolares distendidos e engorgitados por hematias. Nota-se ainda discreta coleção linfocitária em alguns septos interlobulares.

Fígado com espaços-porta contendo numerosas formas jovens de *S. mansoni* nos ramos venosos. Há discreta congestão e infiltração celular dêsses espaços. As células hepáticas acham-se bem conservadas e as células de Kupffer não apresentam alterações.

O baço apresenta cápsula distendida e de espessura normal, a polpa vermelha mostra discreta congestão e os folículos linfóides apresentam um leve aumento de seu centro germinativo. Não há celularidade aumentada.

Rins com glomérulos apresentando leve congestão; nota-se também moderada congestão dos capilares sangüíneos e dos vasos mais calibrosos.

Gânglios linfáticos apresentam folículos com centro germinal hiperplásico, composto de células claras e na periferia linfócitos maduros. Há também certo grau de congestão nos capilares sangüíneos.

Os demais órgãos não apresentam alterações histológicas dignas de registro.

Macacos n.os 2 e 3

Em vista da semelhança entre as lesões observadas nos dois animais, estas serão descritas em conjunto.

Os pulmões são de côr róseo-clara, com pontos de côr vermelha intensa, em forma de "picada de pulga", distribuídos difusamente em todos os lobos de ambos os animais; traquéia e brônquios dão, à expressão, líquido espumoso róseo. Alguns gânglios linfáticos hiperplásicos são encontrados no mediastino. Ao corte, o parênquima pulmonar apresenta-se congestionado.

Nota-se congestão dos órgãos abdominais: o fígado apresenta côr castanho-arroxeada; ao corte, nota-se congestão do parênquima e leve espessamento fibroso dos espaços portais, sendo êste mais acentuado no fígado do macaco n.º 3. Baço com cápsula distendida e algumas áreas de espessamento fibroso. Ao corte, há congestão do parênquima, estando os folículos bem evidentes. Rins congestionados com pontos de hemorragia subcapsular; ao corte, o parênquima mostra intensa congestão, tanto na camada cortical como na medular. Pâncreas de aspecto normal, notando-se numerosos gânglios linfáticos aumentados de volume no tecido peripancreático. O estômago apresenta congestão da mucosa e resto de alimentos, no macaco n.º 2. Os intestinos delgado e grosso apresentam congestão em algumas áreas da mucosa; os gânglios linfáticos mesentéricos apresentam-se hiperplásicos em ambos os animais.

Foram colhidos nos ramos venosos mesentéricos do macaco n.º 2, 300 exemplares adultos de *S. mansoni* e no macaco n.º 3, foram colhidos 270 exemplares adultos do mesmo parasito.

Todos os demais órgãos foram examinados, incluindo-se o sistema nervoso central e glândulas de secreção interna, estando todos de aspecto normal. Foram colhidas amostras de todos os órgãos para estudo histológico.

Exame microscópico — Estão descritos apenas os órgãos em que foram encontradas alterações histológicas: os pulmões em ambos os animais apresentam alvéolos de um modo geral com lúmen ocupado por substância de côr rósea, eosinofílica (edema), notando-se alguns linfócitos e raros plasmócitos livres em pleno alvéolo. Os septos alveolares acham-se dilatados ou espessados pelos capilares sangüíneos túrgidos de hematias e células inflamatórias (polimorfononucleares e mononucleares).

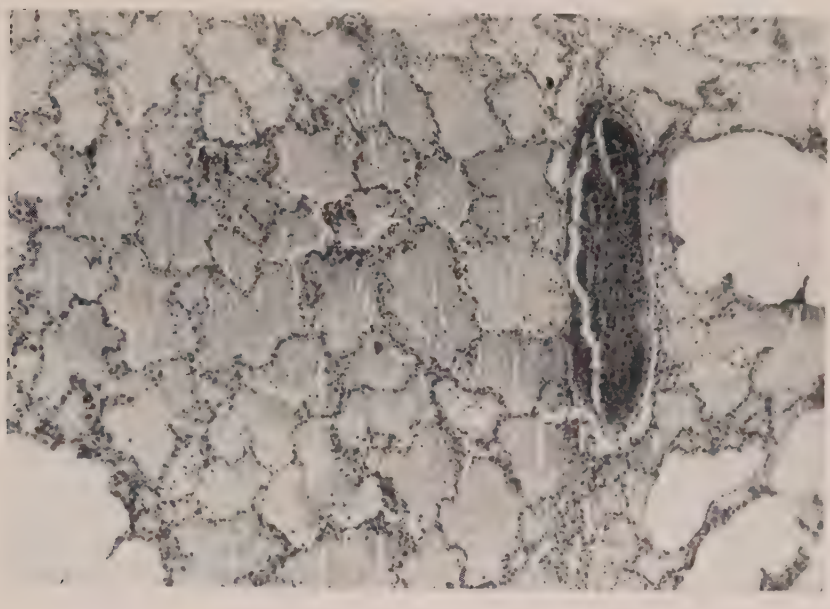

Fig. 1 — Aspecto geral da infiltração celular inflamatória intersticial e edema. (Pulmão). (Obj. 6,3 oc. 10).
Microscópio Reichert-Wien e microfotografia com câmara Leica.

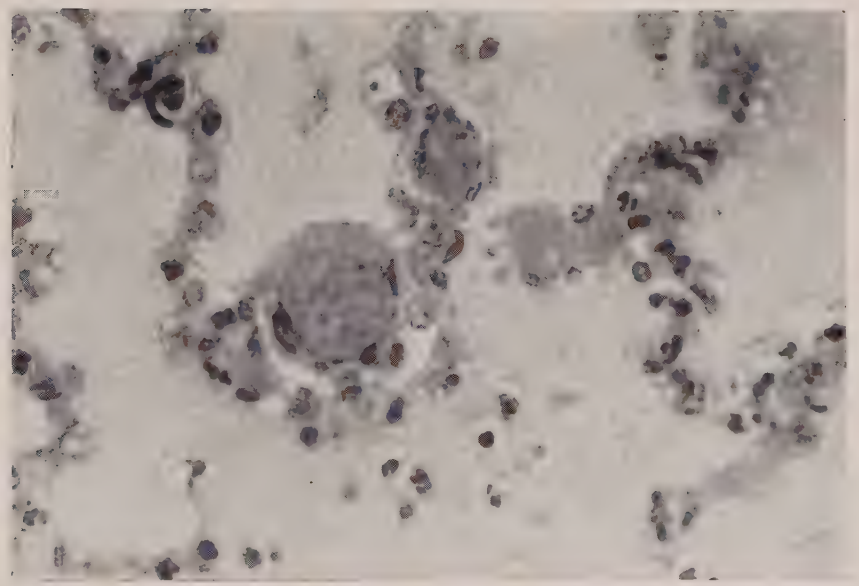

Fig. 2 — Capilares septais dilatados e repletos de material amorfo eosinofílico. Macrófagos, linfócitos e plasmócitos. (Pulmão). (Obj. 60 oc. 10).

Numerosas células histiocitárias acham-se presentes tanto ao longo dos septos alveolares como nos septos interlobulares, onde formam coleção mais numerosa. Estas células são de forma e tamanho variado e freqüentemente apresentam pigmento negro em finos grânulos em seu citoplasma (macrófagos). Outras vêzes, nota-se aspecto fibrinóide nas paredes de arteríolas, com infiltração de linfócitos e tumefação do endotélio, sendo, porém, mais acentuadas no macaco n.º 3.

Os vasos sangüíneos em sua quase totalidade estão dilatados e repletos de hematias (congestão), notando-se que em tôrno das arteríolas e vênulas há sempre um infiltrado compacto de células linfocitárias, alguns plasmócitos e histiócitos.

Brônquios e bronquíolos não apresentam anormalidade a não ser a presença de substância amorfa eosinofílica ocupando o lúmen (edema).

Nos vários cortes examinados, apenas em um corte do pulmão do macaco n.º 2 foi encontrado um verme ocupando um espaço dilatado, provàvelmente uma vênula. Nota-se que o parasito se acha ainda jovem e, se bem que não apresente sinal de alteração em sua estrutura, há uma intensa celularidade em tôrno do vaso cujas paredes se acham aderidas ao verme. Tais células são linfócitos e histiócitos. Vários granulomas peri-ovulares são vistos contendo resto de casca ou mesmo do miracídio, observando-se sempre a presença de substância de aspecto fibrinóide em tôrno dos restos ovulares.

O fígado apresenta espaços-porta com discreta proliferação fibrosa e presença de células mononucleadas no macaco n.º 3 e de polimorfonucleares no macaco n.º 2. Algumas vêzes encontram-se granulomas constituídos pelos elementos celulares descritos e centralizados por restos de ovos de *Schistosoma mansoni*. Êstes granulomas, quando recentes, apresentam, no centro, material eosinofílico amorfo envolvido pela casca quitinosa, notando-se uma grande quantidade de polimorfonucleares eosinófilos. Às vêzes em tôrno dos restos ovulares observa-se material eosinófilo amorfo de aspecto fibrinóide. Os ramos venosos portais de quase todos os espaços-porta de médio e pequeno calibre contêm numerosos parasitos jovens. Notam-se ainda, em alguns espaços-porta, alterações vasculares venosas e arteriais que se caracterizam por tumefação endotelial e degeneração fibrinóide de suas paredes; no macaco n.º 3, ao lado dos parasitos, o lúmen de certas vênulas acha-se ocluído por um "debris" eosinofílico compacto, contendo restos de núcleos de leucócitos (trombos recentes).

As células hepáticas apresentam-se de um modo geral bem conservadas, a não ser em algumas áreas onde se nota certo adelgaçamento dos cordões celulares e dilatação dos sinusóides. Não há, entretanto, sistematização destas alterações: tanto podem estar localizadas nas regiões centrais dos lóbulos, como na região periférica, ou ainda atingirem tôda a extensão dos lóbulos. As células de Kupffer estão com citoplasmas carregados de pigmento pardo, e são muito numerosas. Há ainda grande quantidade de pigmento pardo em finos grânulos fagocitado pelos elementos celulares dos espaços portais.

O baço mostra cápsula levemente espessada por tecido fibro-colágeno. Trabéculas mostram-se também espessadas e com vasos sangüíneos dilatados e congestionados, observando-se, algumas vêzes, discreta infiltração de células linfocitárias e histiocitárias no tecido trabecular.

A polpa branca apresenta-se, de um modo geral, hiperplásica, com folículos grandes e com centro germinativo aumentado, chegando, às vêzes, a ocupar quase a totalidade do folículo. Na periferia observa-se sempre uma orla de côr mais escura, formada pelos linfócitos menores. Os elementos celulares da

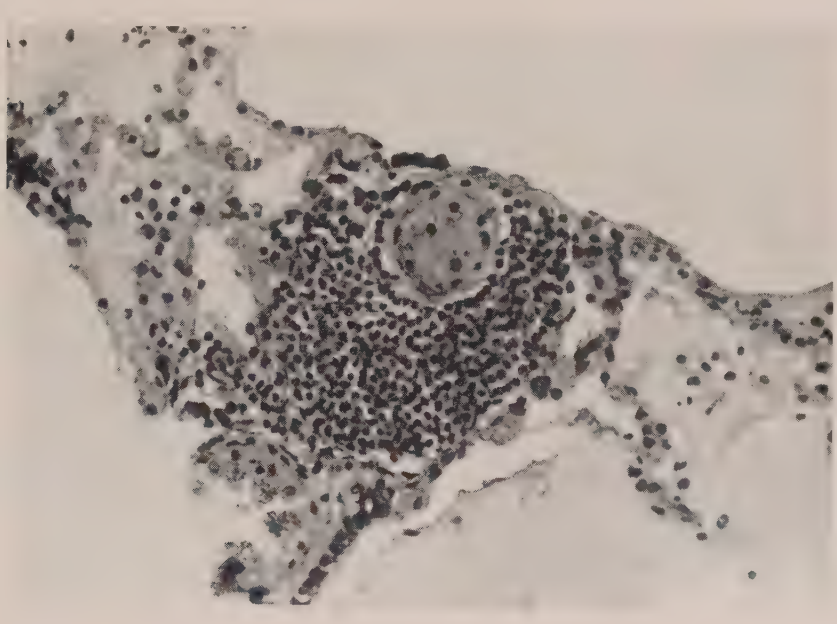

Fig. 3 — Pequena artéria com paredes infiltradas por células inflamatórias. Intensa infiltração inflamatória perivascular. (Pulmão). (Obj. 30 oc. 10).

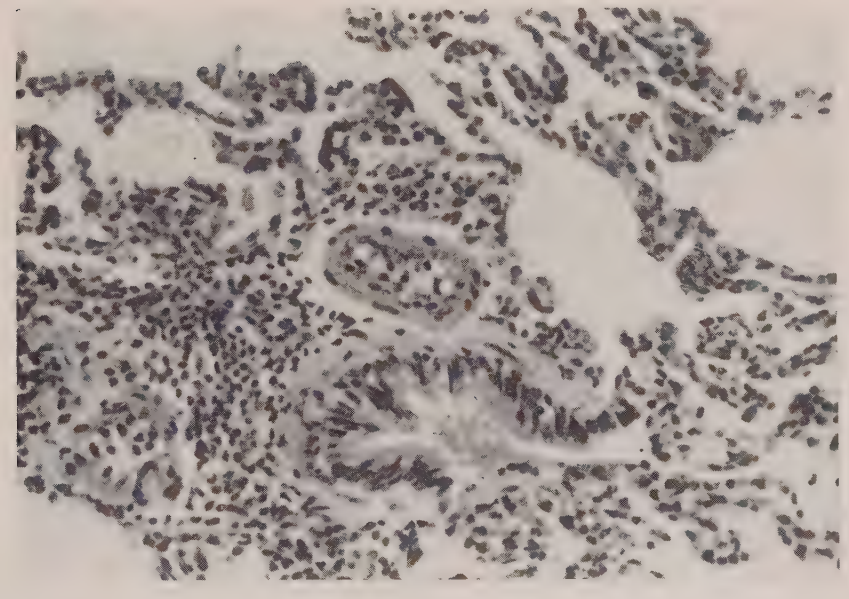

Fig. 4 — Pequena artéria com paredes espessadas, de aspecto fibrinóide, notando-se infiltração do endotélio por células inflamatórias e intensa reação celular periarterial. (Pulmão). (Obj. 30 oc. 10).

região central são mais claros, maiores e, não raramente, observam-se células em divisão nuclear. Nota-se que há maior quantidade de pigmento pardo-escuro, em finos grânulos, livre ou fagocitado dentro dos folículos. A polpa vermelha não apresenta congestão; entretanto, há uma maior celularidade formada às custas de linfócitos, plasmócitos, numerosos macrófagos, pequenos mononucleares e raros polimorfonucleares. Nota-se ainda que há uma intensa hiperplasia das células dos cordões de Billroth.

Nos rins observa-se que o aspecto geral é de uma congestão intensa e hemorragia. Os vasos sangüíneos, tanto da medular como da cortical, mostram-se dilatados e repletos de hematias. Os capilares mostram-se, do mesmo modo, muito distendidos, sendo que, algumas vêzes, nota-se rotura de suas paredes e hemorragia intersticial.

Os glomérulos de Malpighi apresentam o novelo capilar repleto de hematias, notando-se ainda presença de hematias e de "debris" eosinofílico no espaço subcapsular. Algumas vêzes observa-se que os capilares se acham repletos de uma substância amorfa com restos nucleares (trombos recentes). Os túbulos em geral têm o lúmen repleto de material amorfo que se cora fracamente pela eosina e células epiteliais descamadas. O epitélio tubular, de um modo geral, apresenta-se necrótico e descamado. Observa-se ainda grande quantidade de pigmento pardo-escuro em finos grãos depositados no tecido intersticial e em maior quantidade ao nível dos túbulos excretores terminais. Estas lesões renais parecem um pouco mais acentuadas no macaco n.º 3.

Numerosos gânglios linfáticos foram examinados, tanto no tórax (peribrônquicos e mediastinais), como no abdome, êstes em sua maioria mesentéricos.

Há uma intensa hiperplasia linfóide e reticular. Os folículos linfóides estão aumentados de tamanho e constituem-se de células claras, isto é, linfócitos jovens de grande e médio tamanho. Alguns atingem mesmo um maior tamanho e apresentam o nucléolo bem aparente e a cromatina muito esparsa e com leve condensação em tôrno da membrana nuclear. Às vêzes vê-se um material amorfo levemente corado pela eosina, esparso ou formando espécie de filamentos; em geral onde há esta substância há sempre grande número destas células maiores. Notam-se também, nestes centros claros dos folículos, numerosas células, além dos linfócitos que, pelo seu aspecto com núcleo mais ou menos alongado e citoplasma mais abundante, parecem células reticulares jovens ou mesmo histiócitos.

Fora dos folículos há uma intensa celularidade, formada em sua quase totalidade por células mononucleadas, linfócitos e células reticulares de tamanho e forma variada com citoplasma mais ou menos abundante. Os vasos sangüíneos estão dilatados e congestionados.

No pâncreas, além da presença de numerosos granulomas peri-ovulares semelhantes aos já descritos no fígado, nota-se também a presença de parasitos adultos ocupando veias pancreáticas. Ácinos e ductos acham-se normais, a não ser em áreas focais onde se encontram as lesões granulomatosas peri-ovulares.

No intestino delgado como no grosso intestino encontram-se numerosíssimos ovos de *S. mansoni*. Muitos estão com miracídio íntegro, em plena mucosa, outros estão localizados na submucosa e envolvidos por reações granulomatosas. Os primeiros, em geral, não apresentam reação inflamatória em tôrno e parece mesmo que estão a caminho da luz intestinal.

A mucosa apresenta uma infiltração celular mais ou menos difusa, de células linfocitárias, plasmócitos, histiócitos e também polimorfonucleares. As camadas submucosa

Fig. 5 — Aspecto geral das alterações congestivas e hemorrágicas. (Rins). (Obj. 6,3 oc. 10).

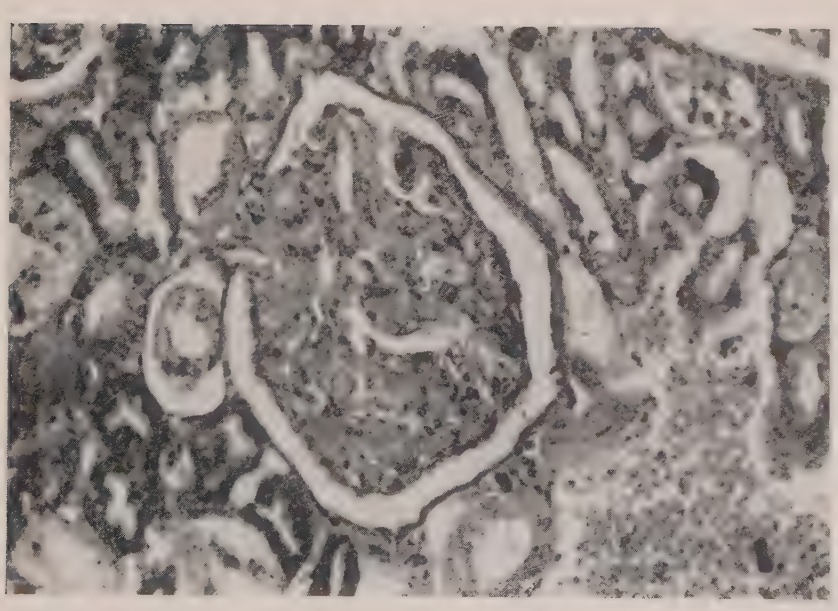

Fig. 6 — Glomérulo congestionado, espessado com áreas de aspecto fibrinóide. Área de hemorragia intersticial. (Rins). Obj. 60 oc. 10).

e muscular mostram maiores alterações. Na submucosa nota-se um espessamento fibroso, com áreas de infiltração celular inflamatória mais ou menos difusa e granulomas em tôrno de ovos, ou de restos dos mesmos. Há também arteríolas que apresentam um moderado espessamento com aspecto fibrinóide de suas paredes e infiltração histiocitária periarterial. O endotélio mostra tumefação dos elementos celulares, deposição de "debris" eosinofílico e presença de polimorfonucleares. As vênulas em geral estão dilatadas e repletas de hematias. Alguns pequenos gânglios linfáticos mesentéricos da serosa intestinal acham-se hiperplásicos com alterações semelhantes aos outros gânglios já descritos.

Macaco n.º 4

Ao exame macroscópico, apenas são observados nódulos branco-amarelados de um ou dois milímetros de tamanho, na superfície do fígado e em menor quantidade nos pulmões. Os intestinos apresentam-se com fezes líquidas e com discretas áreas de congestão na mucosa. Foram retiradas amostram de todos os órgãos para exame histológico.

Nas veias mesentéricas foram colhidos 13 casais de esquistossomas adultos.

Foram observadas, ao exame microscópico, as seguintes lesões:

Pulmão apresentando vasos sangüíneos, artérias, veias e capilares levemente congestionados. Dois parasitos adultos são encontrados dentro de ramos arteriais, não havendo contudo alterações vasculares ligadas aos parasitos. Vários ovos ou restos de ovos são encontrados cercados por uma reação inflamatória granulomatosa, constituída por linfócitos, plasmócitos e histiócitos; alguns dêsses granulomas apresentam ainda células gigantes tipo corpo estranho.

No fígado, os espaços portais apresentam-se em sua maioria levemente espessados por tecido conjuntivo e mostram em grau variado uma infiltração celular inflamatória constituída por linfócitos, histiócitos e alguns plasmócitos. Nota-se também congestão dos ramos venosos portais. Alguns dêsses espaços menores mostram formações granulomatosas, formadas pelos elementos celulares já descritos em tôrno de ovos ou restos de ovos. As células hepáticas apresentam-se bem conservadas, a não ser em algumas áreas próximas aos espaços portais mais espessados pela fibrose, onde se observa certa atrofia dessas células. Células de Kupffer estão em geral carregadas de pigmento pardo-escuro e parecem estar em número aumentado.

O baço apresenta cápsula e trabéculas moderadamente espessadas por tecido fibro-colágeno. Folículos de Malpighi estão um pouco aumentados em tamanho e com centro claro também aumentado, notando-se apenas uma delgada orla periférica escura, formada de linfócitos maduros. No centro dos folículos encontra-se regular quantidade de pigmento escuro em grãos finos, os quais, em sua maioria, se apresentam fagocitados. A polpa vermelha apresenta células reticulares também muito numerosas, e os seios venosos estão repletos de hematias.

O pâncreas com ácinos e ductos bem conservados, notando-se raros granulomas periovulares sem nenhuma característica especial. Alguns gânglios linfáticos peripancreáticos mostram moderada hiperplasia dos folículos linfóides e discreta congestão dos capilares sangüíneos.

Intestinos delgado e grosso apresentam numerosos ovos de *Schistosoma mansoni* na mucosa. A submucosa apresenta formações granulomatosas periovulares em diversas fases evolutivas, sem nenhuma característica especial. Nota-se ainda certa congestão dos capilares e vênulas.

Demais órgãos examinados não apresentam anormalidade.

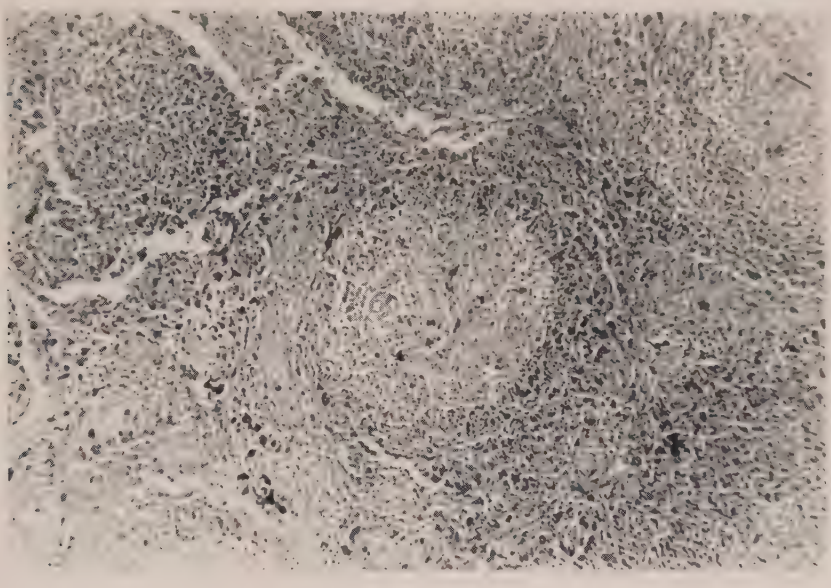

Fig. 7 — Baço mostrando intensa hiperplasia linfo-reticular. Obj. 6,3 oc. 10).

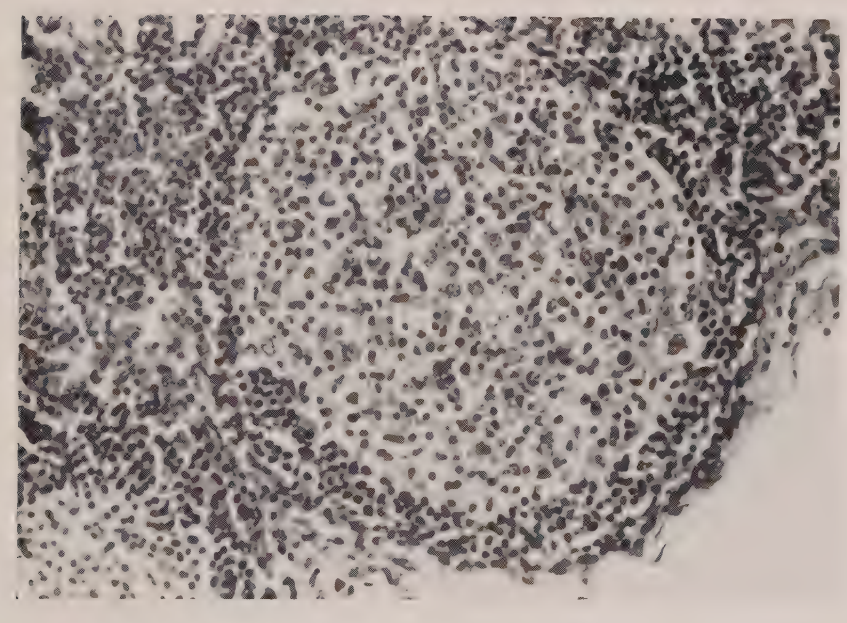

Fig. 8 — Intensa hiperplasia de um gânglio linfático. (Obj. 30 oc. 10).

COMENTÁRIOS

Analisando-se as lesões descritas no capítulo anterior, verifica-se que:

O macaco n.º 1, que foi infestado e, depois de 24 dias, reinfestado, não apresentou lesões provocadas por ovos nem lesões atribuíveis a fenômenos de hipersensibilidade. Conforme observação de vários pesquisadores, só depois de um período de aproximadamente 40 dias é que se inicia a oviposição e, conseqüentemente, se desenvolvem as lesões.

As alterações observadas nos pulmões, baço, fígado, rins e gânglios linfáticos dêsse animal, são lesões congestivas, discretas ou moderadas, que podem ser interpretadas como resultantes da migração dos esquistossômulos.

Como a migração dêsses parasitos (fase septicêmica) pode perdurar por algumas semanas, segundo observações de FAUST & MELENEY [7] e FAUST, JONES & HOFFMAN [6], é possível que o macaco n.º 1 estivesse ainda com alguns parasitos em circulação, ou pelo menos as lesões fôssem resultantes da destruição de alguns esquistossômulos. Conforme tem sido assinalado por alguns autores (CULBERTSON [3]), existe uma reação celular nos pulmões invadidos, sendo porém mais forte a resposta no caso de uma prévia infestação.

Êstes achados têm sido confirmados mais recentemente por MAGALHÃES Filho [10], de modo que, quando atingem os pulmões, os parasitos invasores seguem os capilares e então causam alterações, caminhando ao longo dos tecidos à procura dos vasos eferentes. Quando atingem a circulação geral, espalham-se através do corpo do hospedeiro. Dêste modo são vistos sinais de sua passagem nos pulmões (congestão, hemorragias petequiais, reação inflamatória perivascular, etc.). A migração de cercárias no corpo do hospedeiro permite que um certo número delas se perca nos tecidos de sustentação antes que ganhe o trato portal. Segundo DE WITT [4], a média de vermes colhidos em camundongos infestados por *Schistosoma japonicum* é de 64%.

O animal em estudo sofreu duas infestações com intervalo de 24 dias e sua morte, 24 dias depois, foi motivada por acidente. As lesões descritas neste animal traduzem uma reação contra a segunda infestação ainda possìvelmente em período "septicêmico", mas não a existência de um quadro de hipersensibilidade ou alérgico.

Quanto aos macacos n.^{os} 2 e 3, que foram infestados e reinfestados com intervalos de 1 e 2 anos, respectivamente, verifica-se que ambos morreram 6 e 7 dias após a última reinfestação.

Analisando-se as lesões apresentadas por êstes dois animais, observa-se que êles permaneceram como bons hospedeiros, eliminando uma regular quantidade de ovos viáveis nas fezes e desenvolveram lesões granulomatosas peri-ovulares nos intestinos, fígado, pâncreas, pulmões, etc.

Estas lesões não apresentam caracteres especiais além do que já tem sido descrito por vários autores no homem e em animais de experiência. Entretanto, foram também observados outros aspectos patológicos que caracterizam um estado de hipersensibilidade e que representam o objetivo da presente experiência.

Em primeiro lugar deve-se ressaltar que, com exceção de discretas diferenças de intensidade, os dois animais apresentaram alterações semelhantes.

As lesões pulmonares de caráter inflamatório, difusas e hemorrágicas, associadas à tumefação do endotélio e à presença de material acidófilo de aspecto fibrinóide, nos capilares e arteríolas, indicam a sua natureza alérgica.

KLINGE [apud 19] produziu hipersensibilidade anafilática com injeções repetidas de proteína estranha em animais. A hipersensibilidade em animais afeta os músculos lisos, o endotélio vascular e as fibras colágenas.

Estudos histológicos têm demonstrado a presença de massas eosinofílicas nos capilares pulmonares, distendidos e congestionados, de coelhos, seguindo-se ao choque ana-

filático. A maioria dos autores considera êstes trombos como resultado de alterações focais nos capilares produzidas por uma reação antígeno-anticorpo. A localização específica de antígenos nestes trombos pulmonares em animais sensibilizados, usando-se a técnica de antígenos fluoresceinizados, sugere fortemente que êles são precipitados antígeno-anticorpo (McKinnon [9]).

No caso dos macacos 2 e 3, um grau elevado de hipersensibilidade parece ter-se desenvolvido, desde que êstes animais permaneceram durante longo período eliminando grande quantidade de ovos de *Schistosoma mansoni*. Conseqüentemente, foi produzida uma considerável quantidade de substâncias antigênicas com a destruição de ovos e parasitos nos tecidos do hospedeiro.

Conforme já foi demonstrado em outras experiências, parece fora de dúvida a existência de um mecanismo imuno-alérgico responsável pela destruição de cercárias de *schistosomas* ao nível dos capilares e vasos sangüíneos pulmonares.

Outras lesões foram observadas nos rins, fígado, baço e gânglios linfáticos, semelhantes àquelas descritas nos pulmões.

Nos rins de ambos os animais observa-se a presença de um "debris" eosinofílico, ocupando a luz de capilares glomerulares, alterações de aspecto fibrinóide nos capilares e até formação de trombos recentes, além de congestão e hemorragia provàvelmente secundárias às lesões descritas.

Os aspectos observados no fígado, baço e gânglios linfáticos, mostram uma hiperplasia do sistema retículo-endotelial.

No fígado há uma intensa hiperplasia das células de Kupffer, que se apresentam, em geral, fagocitando pigmento esquistossomótico. Nota-se também a presença de grande quantidade de células nos espaços portais, não só em tôrno dos ovos, mas também de modo difuso, formando um infiltrado denso. Estas células em geral são histiócitos, fagócitos, com citoplasma carregado de pigmento esquistossomótico, linfócitos e plasmócitos.

No baço é evidente uma intensa hiperplasia linfóide e reticular. Os folículos quase não apresentam linfócitos maduros dada a intensa atividade do centro germinativo. Os elementos reticulares fixos e móveis acham-se também aumentados em número.

Do mesmo modo os gânglios linfáticos torácicos e abdominais acham-se hiperplásicos.

Êstes aspectos demonstram uma exaltação do sistema retículo-endotelial nos órgãos onde são mais encontrados os elementos que compõem êste sistema.

Benacerraf & col.[1], estudando órgãos de animais que foram injetados com substâncias estranhas em forma de partículas, demonstraram que o fígado e o baço continham cêrca de 80 a 90% das substâncias injetadas.

Sabendo-se que êstes dois animais foram infestados com número elevado de cercárias, é fácil compreender a intensa atividade fagocitária dos elementos do S.R.E.

Êstes aspectos vêm, pois, confirmar o estado "imuno-alérgico" em que se encontravam êstes animais motivado pelo alto teor de substâncias antigênicas de que presumìvelmente eram portadores.

Dêste modo, pode-se concluir que as últimas reinfestações, feitas com número muito elevado de cercárias, desencadearam uma reação do tipo "hipersensibilidade anafilática", sobrevindo então a morte dos animais.

Finalmente, o macaco n.º 4, que foi infestado uma só vez e sacrificado um ano depois, apresentou lesões nos pulmões, fígado e intestinos produzidas por ovos de *Schistosoma mansoni*.

Estas lesões eram granulomas peri-ovulares em diversas fases evolutivas, ou restos fibrocitários dêsses granulomas.

Não foram observadas alterações difusas congestivas ou inflamatórias semelhantes àquelas interpretadas como dependentes de um estado alérgico.

O estudo histológico das lesões observadas nesse animal, serviu para demonstrar que uma leve infestação, não sendo seguida de reinfestações, provàvelmente não acarreta grandes alterações para o organismo.

CONCLUSÕES

1.°) Macacos do gênero *Cebus*, experimentalmente infestados com *Schistosoma mansoni*, demonstraram ser bons hospedeiros.

2.°) Uma reinfestação maciça, realizada 24 dias depois da primoinfestação, determinou fenômenos congestivos nos pulmões, fígado, baço e rins.

3.°) Êste achado confirma a opinião de outros autores de que existe uma reação no organismo de hospedeiros motivada pela migração de cercárias de *schistomas*.

4.°) Animais infestados e reinfestados com intervalo de 1 e 2 anos, sucumbiram poucos dias depois de forte reinfestação.

5.°) As lesões observadas nestes animais caracterizam um estado de hipersensibilidade provàvelmente exacerbada pela invasão de elevado número de cercárias.

6.°) As lesões pulmonares e renais, pelo seu caráter acentuado e difuso, parecem justificar a morte dêstes animais.

SUMMARY

Hypersensitivity reactions in monkeys of the genus Cebus *infested with* Schistosoma mansoni.

A brief bibliographical revision demonstrated that resistance manifestations acquired by experimental animals after one or more infestations with schistosomae characterize an immuno-allergic mechanism and that this state of relative immunity or premunition bears relation with absorption of substances resulting from destruction of parasites and their eggs in the host's organism.

By promoting multiple infestations with *Schistosoma mansoni* in monkeys of the genus *Cebus* sp., the Author has been able to conclude that a re-infestation with a twenty four-day interval from the first one did not evoke hypersensitivity reactions; animals infested and re-infested after one or two year intervals presented reactions against the last infestation, grave pulmonary and renal lesions being present, characteristic of a state of hypersensitivity which caused death of the animals.

REFERÊNCIAS

1. BENACERRAF, B.; BIOZZI, G.; HALPERN, B. N. & STIFFEL, C. — Physiology of phagocytosis of particles by the R. E. S. Symposium on physiopathology of the reticuloendothelial system, Paris. Springfield, Charles Thomas, 1955. p. 52-77.

2. CULBERTSON, J. T. — Cercaricidal action of normal serums. J. Parasitol. **22**:111-125, 1936.

3. CULBERTSON, J. T. — Immunological mechanisms in parasitic infections. (*In* Most, H., ed. — Parasitic infections in man. New York, Columbia Univ. press, 1951. p. 19-36).

4. DE WITT, W. B. — A useful technique for exposure of animals to cercariae of *Schistosoma japonicum*. J. Parasitol. **40**:234, 1954.

5. FAIRLEY, N. H. — Discussion on immunity to animal parasites: metazoal immunity. Proc. Roy. Soc. Med. **31**:1291-1298, 1938.

6. FAUST, E. C.; JONES, C. A. & HOFFMAN, W. A. — Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. Puerto Rico J. Pub. Health & trop. Med. **10**: 133-196, 1934.

7. FAUST, E. C. & MELENEY, H. E. — Studies on schistosomiasis japonica. Amer. J. Hyg. Monogr. Ser. (3), 1924.

8. KAGAN, I. G. & MERANZE, D. R. — The histopathology of immune and normal mouse skin exposed to cercariae of *Schistosomatium douthitti* (Trematoda, Schistosomatidae). J. infect. Dis. **97**:187-193, 1955.

9. McKINNON, G. — Role of "in vivo" antigen antibody precipitation in hypersensitivity reactions. (*In* Mechanisms of hypersensitivity: Henry Ford Hospital international symposium. Toronto, Little Brown, 1959. p. 163-172).

10. MAGALHÃES Filho, A. — Pulmonary lesions in mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **8**:527-535, 1959.

11. MAGALHÃES Filho, A. & COELHO, R. B. — Estudo histopatológico da penetração de cercárias de *S. mansoni* na pele de camundongos prèviamente infestados. An. Soc. Biol. Pernambuco **16**:269-281, 1957.

12. MARQUES, R. J. — A propósito da chamada fase toxêmica da esquistossomose mansônica. An. Fac. Med. Univ. Recife **17**:243-256, 1957.

13. NEWSOME, J. — Problems of fluke immunity with special reference to schistosomiasis. Tr. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg. **50**: 258-274, 1956.

14. OLIVIER, L. & WEINSTEIN, P. P. — Experimental schistosome dermatitis in rabbits. J. Parasitol. **39**:1-12, 1953.

15. OLIVIER, L. J. & SCHNEIDERMAN, M. — Acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection in laboratory animals. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **2**:298-306, 1953.

16. SERGENT, E. D.; PARROT, L. & DONATIEN, A. — Premunition et immunité dans le paludisme et dans d'autres maladies. Tr. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg. **27**:277-280, 1953.

17. STIREWALT, M. A. — The influence of previous infection of mice with *Schistosoma mansoni* on a challenging infection with the homologous parasite. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **2**:867-882, 1953.

18. VOGEL, H. von & MINNING, W. — Ueber die erworbene Resistenz von *Macacus rhesus* gegenüber *Schistosoma japonicum*. Ztschr. Tropenmed. & Parasitol. **4**:418-505, 1953.

19. WAGNER, B. M. — Hypersensitivity: the role of the connective tissue. (*In* Mellors, R. C., ed. — Analytical pathology... New York, Blakiston, 1957. p. 429-470).

20. WATARAI, J. — Studies on the skin reaction caused by *Schistosoma japonicum* cutaneously applied on the animals. Japan. J. exper. Med. **14**:378-386, 1936.

Recebido para publicação em 9 outubro 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(5):254-260, setembro-outubro 1961

CDU 616.937.3:
614.484:615.778.23

ESTUDO COMPARATIVO DA AÇÃO TRIPANOSSOMICIDA "IN VITRO" DA VIOLETA DE GENCIANA E DO CRISTAL VIOLETA. PRIMEIROS ENSAIOS COM O EMPRÊGO DO VERDE DE METILA

Judith Kloetzel [1]

RESUMO

A autora faz o estudo comparativo quanto ao espectro cromatográfico e quanto à atividade sôbre o *Trypanosoma cruzi* dos corantes metil violeta, cristal violeta e violeta de genciana de diversas procedências, a fim de avaliar a possibilidade de seu emprêgo como profilático da moléstia de Chagas em bancos de sangue.

Conclui que:

1. Os cristais violeta apresentam-se à cromatografia com três frações azuladas distintas, enquanto que algumas violetas de genciana têm espectro semelhante a êste, outras ainda possuindo fração avermelhada.

2. O cristal violeta tem ação tripanossomicida idêntica à violeta de genciana de igual espectro cromatográfico; a violeta de genciana "avermelhada" é menos ativa.

3. Na profilaxia da moléstia de Chagas em bancos de sangue recomenda-se o emprêgo do cristal violeta (C.I. 681), numa concentração final de 1:4.000, a partir de uma solução a 0,5% em sôro glicosado, sendo o tempo de contato entre a droga e o sangue de no mínimo 24 horas à temperatura de geladeira.

4. O emprêgo do cristal violeta ao invés da violeta de genciana, apresenta a vantagem de uma composição constante, sendo que a tolerância de ambos os corantes é idêntica.

Foi investigado também o verde de metila, corante mais metilado que os outros membros da série, constatando-se acentuada ação tripanossomicida. Recomendam-se maiores investigações em tôrno desta droga.

INTRODUÇÃO

O problema da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue continua a merecer atenção, mormente em nosso meio, onde ainda é acentuada a incidência da infecção em doadores. Segundo o critério de seleção dêstes candidatos e sua procedência, esta incidência varia na cidade de São Paulo entre 1,0% [3], 1,7-2,5% [4] e 4,0% [8]. Outras investigações mostraram a incidência de 14,9% em São José do Rio Prêto (São Paulo), 21,1% em Ribeirão Prêto (São Paulo), 19,1% em Araguari (Minas Gerais)[1], 2,4% em Belo Horizonte (Minas Gerais)[9], 15% em Uberaba (Minas Gerais)[5] e 3,6% em Recife (Pernambuco)[10].

Em 1953, Nussenzweig & col.[7] demonstraram que a violeta de genciana em uma concentração final de 1:4.000 mata o *Trypanosoma cruzi* quando em contato com o parasito durante 24 horas em sangue armazenado em geladeira. Sendo a violeta de genciana uma mistura mal definida, composta de cloreto de hexa-, penta- e tetra-metil-pararo-

(1) Do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. Antônio Dácio Franco do Amaral).

KLOETZEL, J. — Estudo comparativo da ação tripanossomicida «in vitro» da violeta de genciana e do cristal violeta: primeiros ensaios com o emprêgo do verde de metila. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:254-260, 1961.

sanilina [2], NUSSENZWEIG & col.[6, 7] experimentaram a ação de um metil violeta, composto principalmente por cloreto de tetra-metil-pararosanilina, bem como do cristal violeta, que é o cloreto de hexametil-pararosanilina puro. Verificaram que o metil violeta era bastante menos ativo que a violeta de genciana e o cristal violeta, apesar de resultados inicialmente encorajadores [7], quando submetido a estudo mais minucioso, não esterilizou o sangue por completo na concentração de 1:4.000, sendo que 12,6% dos camundongos inoculados com sangue positivo submetido à ação do cristal violeta a 1:4.000 durante 24 horas, apresentaram parasitemia [6].

Retomamos o estudo neste ponto, numa tentativa de verificar a composição da violeta de genciana originalmente empregada por NUSSENZWEIG & col.[7], assim como de identificar a parte ativa da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Os corantes estudados foram colocados em tubo de ensaio, triturados no próprio tubo, suspensos em solução glicosada a 5% para a realização dos exames biológicos e em água destilada para as cromatografias, colocados em banho-maria a 100°C, filtrados, ampolados e autoclavados. Evitou-se desta forma a perda de corante que habitualmente ocorre com a trituração em almofariz. As soluções foram preparadas a 0,5% quando usadas para ensaios biológicos e a 1,0% para as cromatografias.

Na cromatografia ascendente, empregou-se papel Whatmann n.º 4 e como solvente o álcool etílico a 40%.

Nas experiências com sangue infectado foi empregada a cêpa Y de *Trypanosoma cruzi*, estudada por SILVA & NUSSENZWEIG [11], que se mostrou 100% infectante e mortal para 93,7% dos camundongos jovens.

O sangue era obtido por punção cardíaca de camundongos infectados, misturado à solução ACD na proporção de aproximadamente 70% de sangue e 30% de solução ACD, o que corresponde aos padrões habituais em banco de sangue. Utilizamos sempre camundongos altamente parasitados, isto é, apresentando aproximadamente 150 parasitos por 50 campos microscópicos (×320).

Nas experiências "in vitro" êste sangue era colocado em contato com os corantes e observado a fresco, entre lâmina e lamínula, após tempos variáveis.

Para as experiências em animais, êste sangue era misturado aos corantes, na proporção de 0,05 ml da solução a 0,5% do corante por centímetro cúbico de sangue infectado, correspondente a uma concentração final de 1:4.000. Êste sangue era guardado 24 horas em geladeira, em seguida inoculado por via intraperitoneal em camundongos de 20-30 dias de idade, empregando-se 0,2 ml por animal. Os animais testemunhos eram inoculados com o sangue misturado à solução glicosada na mesma proporção e mantido em geladeira pelo mesmo espaço de tempo.

Inicialmente os animais eram examinados cada 3 dias, mais tarde cada 4-5 dias, durante 2 meses, por inspeção de gôta de sangue a fresco. Em seguida eram sacrificados e os cortes histológicos do coração examinados.

Foram empregados os seguintes corantes:

1. Violeta de genciana (Eli Lilly & Co., Indianapolis — Partida 5853-W89722).
2. Cristal violeta (Hartman-Leddon Co. — Total dye content 97% — C.I. 681).
3. Cristal violeta (E. Merck A.G.).
4. Violeta de genciana B (E. Merck A.G.).
5. Metil-violeta (Dr. G. Gruebler & Co.).
6. Cristal violeta DC 7 (Difco Lab., Detroit, Mich. — Actual dye content 96%).
7. Violeta de genciana (Dr. G. Gruebler & Co.).
8. Methyl green (G. T. Gurr, London).
9. Methylengrün (Dr. G. Gruebler & Co.).
10. Jodgrün (Dr. G. Gruebler & Co.).
11. Cristal violeta (Paul-Lewis Lab. Inc.).

RESULTADOS

1) *Cromatografia.*

Verificamos na cromatografia em papel que a migração decompõe os cristais violeta em três partes, de aspecto azulado; o metil

violeta avermelhado, apresenta Rf menor, ficando em parte no ponto de partida. No que diz respeito às violetas de genciana, algumas delas apresentam aspecto semelhante ao cristal violeta, enquanto outras contêm componente avermelhado, também com Rf baixo.

A cromatografia com a violeta de genciana de Eli Lilly & Co. tem aspecto semelhante à dos cristais violeta, enquanto que a violeta de genciana de Dr. G. Gruebler & Co. e a violeta de genciana B da E. Merck A.G. apresentam, além das frações azuis idênticas ao cristal violeta, também uma fração mais avermelhada, com Rf menor.

Estas diferenças identificadas pela cromatografia encontram paralelo nos ensaios biológicos.

2) *Ensaios "in vitro".*

Misturando-se o sangue infectado dos camundongos com as soluções corantes e observando os parasitos após breve tempo de contato, os resultados obtidos são os representados no Quadro I.

QUADRO I

Ação de concentrações diversas dos corantes sôbre o *Trypanosoma cruzi*.

CORANTE USADO	Concentração	Tempo de contato * (minutos)	Resultado
Metil Violeta			
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 30	Muitos tripanosomas vivos, movimentos pouco alterados.
Cristais violeta			
Hartman-Leddon Co.	1:2.000	5	Todos mortos.
	1:3.000	5	Todos mortos.
	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
	1:6.000	Até 10	Raros vivos.
E. Merck A.G.	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
E. Merck (partida recente) ...	1:4.000	Até 5	Alguns vivos.
	1:4.000	Até 10	Todos mortos.
Difco Lab.	1:4.000	Até 10	Raros vivos.
	1:4.000	Até 15	Todos mortos.
Paul-Lewis Lab. Inc.	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 5	Alguns vivos, com movimentos alterados.
	1:4.000	Após 10	Todos mortos.
Violetas de genciana			
I — "Avermelhadas"			
E. Merck A.G.-B	1:4.000	Até 30	Alguns vivos, com movimentos inalterados.
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 15	Muitos vivos.
II — Com aspecto idêntico ao cristal violeta			
Eli Lilly & Co.	1:2.000	5	Todos mortos.
	1:3.000	5	Todos mortos.
	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
	1:6.000	Após 15	Raros vivos.

* Alguns corantes não se dissolveram completamente em água. Nestes casos a concentração real foi determinada pela comparação fotométrica com solução alcoólica, utilizando-se fator de correção.

Por conseguinte foi possível verificar que todos os cristais violeta têm atividade semelhante, sendo perfeitamente comparáveis à violeta de genciana "azul". As violetas de genciana "avermelhadas" têm ação tripanossomicida muito menos pronunciada.

Êstes achados também foram confirmados pelos ensaios "in vivo".

3) *Ensaios "in vivo".*

A inoculação em animais do sangue infectado deixado em contato com os corantes em geladeira durante 24 horas, revelou os resultados representados no Quadro II.

QUADRO II

Animais inoculados com sangue infectado e que ficou durante 24 horas na geladeira em contato com o corante.

CORANTE USADO	Concentração	Animais inoculados					
		Com o sangue tratado com o corante			Testemunhos		
		Nº	Nº de positivos	Nº de mortos	Nº	Nº de positivos	Nº de mortos
Metil violeta	1:4.000	12	12	12	6	6	6
Violetas de genciana "Avermelhadas"							
E. Merck A.G.-B	1:4.000	16	10	7	4	4	4
Dr. G. Gruebler & Co. ..	1:4.000	10	10	8	2	2	2
Cristais violeta							
Hartman-Leddon Co. ...	1:4.000	43	0	0	9	9	9
E. Merck A.G.	1:4.000	15	0	0	4	4	4
Difco Lab.	1:4.000	9	0	0	—	—	—

Os dados por nós apresentados realmente indicam que os cristais violeta têm atividade idêntica à da violeta de genciana da Eli Lilly & Co.[6], enquanto que as outras violetas de genciana, avermelhadas, são menos ativas sôbre o *Trypanosoma cruzi.*

Uma vez que o metil violeta, isto é, o cloreto de tetrametil-pararosanilina, tem atividade menos pronunciada sôbre os tripanosomas que a violeta de genciana, composto hexametílico, tivemos a idéia de ensaiar ainda o corante denominado verde de metila, composto com mais um grupo metílico em sua molécula, sendo o cloreto de heptametil-pararosanilina. O nome comercial "verde de metila" é empregado indiferentemente para o composto verde de metila e verde de etila [2]; como os fabricantes das drogas por nós ensaiadas não fornecem o "colour index" no rótulo, acreditamos que as discordâncias verificadas entre os resultados experimentais com os dois corantes devam-se à falta de uniformidade na nomenclatura comercial.

Deliberamos também experimentar o corante Jodgruen, que é o cloreto de octa-metil-pararosanilina.

Os resultados por nós obtidos são os expostos no Quadro III.

Êstes dados nos animaram a efetuar ensaios "in vivo" com o corante Methylgreen (Quadro IV).

QUADRO III

Ação de concentrações diversas do verde de metila e do Jodgruen sôbre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro".

CORANTE USADO	Concentração	Tempo de contato (minutos)	Resultado
Jodgruen			
(Dr. G. Gruebler & Co.)	1:4.000	15	Todos vivos.
Methylengruen			
(Dr. G. Gruebler & Co.)	1:4.000	15	Todos vivos.
Methyl green			
(G. T. Gurr)	1:4.000	5	Alguns mortos.
	1:4.000	10	Raros vivos.
	1:4.000	15	Todos mortos.
	1:6.000	10	Alguns vivos, com movimento alterado.
	1:6.000	40	Raros vivos, com movimento alterado.
	1:8.000	30	Raros vivos, com movimento alterado.
	1:8.000	50	Raros vivos, quase imóveis.

QUADRO IV

Animais inoculados com sangue infectado e que ficou durante 24 horas na geladeira em contato com o corante Methylgreen (G. T. Gurr, London).

Concentração	Nº de animais inoculados	Nº de animais positivos
1:4.000	12	0
1:6.000	6	0
Testemunhos	4	4

O tempo de sobrevida máximo dos animais testemunhos foi de 20 dias.

Verificamos assim que o Methylengrün e o Jodgrün em concentração de 1:4.000 não têm atividade sôbre os tripanosomas após tempo de contato de 15 minutos, enquanto que o Methylgreen da G. T. Gurr, a uma concentração de 1:4.000 mata todos os parasitos em 15 minutos, ainda tendo acentuada ação tripanossomicida a 1:8.000. Doze camundongos inoculados com o sangue infectado mantido em contato com a droga em geladeira durante 24 horas e 6 camundongos inoculados nas mesmas condições com a droga a 1:6.000, não contraíram a doença.

Os animais negativos nas experiências discriminadas no Quadro II foram sacrificados com 2 meses, os cortes histológicos do miocárdio confirmando a negatividade. Os animais submetidos ao ensaio preliminar com Methylgreen foram sacrificados após período idêntico, porém não foram feitos cortes histológicos.

Tentamos reproduzir o espectro cromatográfico da violeta de genciana "avermelhada" misturando o cristal violeta com o metil violeta em proporções diversas. Porém mesmo usando uma mistura de 70% de solução de metil violeta e 30% de solução de cristal violeta, o aspecto cromatográfico apresenta-se com a fração de RF maior (portanto correspondente ao cristal violeta) bastante mais

pronunciada que a da violeta de genciana vermelha, e a fração de Rf mais baixo, correspondente à fração vermelha, muito menos pronunciada que a obtida com a violeta de genciana vermelha.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A série de experiências feitas permite, a nosso ver, a conclusão de que o cristal violeta pode substituir com vantagem a violeta de genciana na profilaxia da doença de Chagas em banco de sangue. Enquanto a violeta de genciana é corante de composição variável de fabricante para fabricante, algumas amostras tendo ação tripanossomicida total e outras não conseguindo esterilizar o sangue, o cristal violeta é composto bem definido.

Acreditamos que a discordância entre os nossos resultados e aquêles de NUSSENZWEIG & col.[6, 7] que não conseguiram esterilização completa do sangue com o cristal violeta de Hartman-Leddon Co., em uma concentração de 1:4.000, se deva ao método de solubilização do corante. Tivemos o hábito de sempre triturar o corante no próprio tubo, evitando assim a perda que é habitual na trituração em almofariz.

É interessante salientar a atividade tripanossomicida do verde de metila. Uma vez que o metil violeta, do grupo aquêle que menos radicais metílicos possui e de menor pêso molecular, é o menos ativo do grupo, achamos útil prosseguir as investigações em tôrno da atividade do verde de metila, um dos mais metilados da série. Um estudo comparativo e de sentido mais amplo do que êste nosso primeiro ensaio, mostrará se realmente a atividade contra o *Trypanosoma cruzi* corre paralelamente ao número de radicais metílicos presentes na molécula do corante.

Em conclusão, recomendamos que os bancos de sangue passem a empregar o cristal violeta C.I. 681, corante de fórmula conhecida e composição constante, em lugar da violeta de genciana, que varia de fabricante a fabricante, de lote para lote. Empregar-se-á o cristal violeta a partir de uma solução a 0,5% em sôro glicosado, numa concentração final de 1:4.000.

Não há restrições quanto ao emprêgo do cristal violeta nesta concentração, igual à anteriormente preconizada para a violeta de genciana, pois que quando os autores se referem à "violeta de genciana", muitas vêzes na realidade trabalham com o cristal violeta, já que os têrmos muitas vêzes são empregados como sinônimos. Tem-se certeza apenas da composição exata do cristal violeta quando êste leva o número C.I. 681, codificado.

SUMMARY

Comparative study of trypanocidal activity of gentian violet and crystal violet "in vitro". First trials with methyl green.

Since 1953 the usefulness of gentian violet in the prophylaxis of Chagas disease has been well-known and blood banks in Brazil have been employing this stain in a final concentration of 1:4000 in blood stored at a low temperature for at least 24 hours.

In the present paper the author makes a comparison between gentian violet and the stains crystal violet and methyl violet as to biological acitivity against *Trypanosoma cruzi* and as to their chromatographic spectra.

The following conclusions were reached:

1. Crystal violet presents three "blue" fractions on chromatography. Gentian violet varies in composition, some batches exhibiting spectra similar to crystal violet while others also contain a "reddish" fraction.

2. The biological acitivity of crystal violet and "blue" gentian violet is identical; the "reddish" gentian violet, however, is less active.

3. Since crystal violet is a definite compound, without the variability in composition shown by commercial gentian violet, the use of the former stain in the prophylaxis of Chagas disease in blood banks is to be recommended.

The stain should be used in a final concentration of 1:4000, starting from 0.5%

solutions in glycose, and the blood stored in the refrigerator for at least 24 hours.

The author has also investigated the stain called methyl green, the most methylated of this series of stains. Biological tests have shown that methyl green exhibits a high order of activity against *Trypanosoma cruzi* and further work along these lines is called for.

REFERÊNCIAS

1. BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P. de; AMATO *Neto,* V.; NUSSEZWEIG, V. & SONNTAG, R. — Investigações sorológicas sôbre doença de Chagas entre candidatos a doadores em bancos de sangue nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Hospital, Rio de Janeiro **44**:745-749, 1953.

2. CONN, H. J. — Biological stains. 5th ed. Geneva (N.Y.), Biotech. publications, 1946.

3. FARIA, R.; MELLO, N. R. & MURAT, L. G. — Contribuição para o estudo médico e social do doador de sangue. Folia clin. & biol. **16**:158-168, 1950.

4. FREITAS, J. L. P. de; BIANCALANA, A.; AMATO *Neto,* V.; NUSSEZWEIG, V.; SONNTAG, R. & BARRETTO, J. G. — Moléstia de Chagas em bancos de sangue na Capital de São Paulo. Hospital, Rio de Janeiro **42**: 229-236, 1952.

5. JANTENE, A. D. & JACOMO, R. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. Rev. goiana Med. **5**:23-30, 1959.

6. NUSSENZWEIG, V.; AMATO *Neto,* V.; FREITAS, J. L. P. de; NUSSENZWEIG, R. S. & BIANCALANA, A. — Moléstia de Chagas em bancos de sangue. Rev. Hosp. Clín. **10**:265-283, 1955.

7. NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P. de; AMATO *Neto,* V. & KLOETZEL, J. — Ação de corantes tri-fenil-metânicos sôbre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro": emprêgo da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. Hospital, Rio de Janeiro **44**:731-744, 1953.

8. PASSALACQUA, C. de S. P.; AMATO *Neto,* V.; ZATZ, I. & DAMASCO, A. — Incidência da doença de Chagas entre os candidatos a doadores de um banco de sangue de São Paulo: inquérito sorológico. Hospital, Rio de Janeiro **43**:443-447, 1953.

9. PELLEGRINO, J.; BOROTCHIN, M.; LEITE, G. & BRENER, Z. — Inquérito sôbre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **49**:555-564, 1951.

10. SILVA, L. H. P. da & LIMA, D. — Pesquisa de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* entre candidatos a doadores em banco de sangue do Recife, Pernambuco. Publ. méd. **27** (195):23-25, 1956.

Recebido para publicação em 23 agôsto 1961.

Livros recebidos

SEELIGER, H. P. R. — LISTERIOSIS. Basel, S. Karger, 1961. 308 págs., 67 ilustrações, 5 em côres.

SEELIGER, da Universidade de Boon, na Alemanha, acaba de publicar, em inglês, apreciado trabalho sôbre uma infecção bacteriana que, dia a dia, maior importância adquire em patologia médica e veterinária.

Prefaciando o livro de SEELIGER, o Prof. K. F. MEYER refere, com razão, que a distribuição cosmopolita da listeriose e os prejuízos econômicos que provoca dão uma idéia da importância desta infecção que deve merecer a atenção dos clínicos e epidemiologistas para que se estabeleçam, a respeito dela, concepções mais bem definidas.

Listeria monocytogenes é uma bactéria capaz de infetar grande número de espécies animais. A listeriose é doença que apresenta sintomatologia extremamente variável, demonstrando-se a passagem transplacentária do microrganismo.

A história desta infecção começou em 1926, quando o germe em aprêço foi descrito por MURRAY, WEBB & SWAN, por ocasião de uma epizootia em cobaios e coelhos de alguns laboratórios, em Cambridge. No decurso da infecção, os coelhos apresentavam, de modo consistente, monocitose. A bactéria passou a ser denominada *Bacterium monocytogenes* e, em 1940, PRIE sugeriu mudar o nome genérico para *Listeria*. Em que pesem algumas opiniões contrárias, *Listeria monocytogenes* é um nome taxonômicamente válido, podendo ser considerado como "entidade" morfobiológica bem definida. Trata-se de uma bactéria ciliada, portadora de granulações polares, Gram-positiva, cultivando-se bem entre 20°C e 37°C, em meios ligeiramente alcalinos.

Do ponto de vista bioquímico, *L. monocytogenes* apresenta grande uniformidade, em contraste com a multiplicidade de tipos sorológicos (1, 2, 3, 4a e 4b),

As amostras recentemente isoladas são tôdas elas patogênicas para animais de laboratório. A prova de Anton (cérato-conjuntivite) é considerada como clássica para demonstrar a patogenicidade ou a virulência desta bactéria. PATERSON foi o primeiro autor a infetar ovos embrionados (membrana cório-alantóide), com lesões bastante típicas.

Quanto à patologia da listeriose, ainda que a localização e sede de predileção das alterações tissulares varie de hospedeiro para hospedeiro, em linhas gerais, ela se assemelha nas diferentes espécies animais.

A listeriose provoca esporàdicamente ou em surtos epizoóticos, infecções em numerosos animais. A doença inicia-se com processo septicêmico que depois se localiza, com lesões predominantes para o lado do sistema nervoso central. A infecção do animal, em estado de prenhez, pode provocar dano e morte do feto ou abôrto. A administração precoce de tetraciclina e preparados sulfonamídicos permite a cura de numerosos casos.

No homem, a listeriose pode se manifestar com diversos quadros clínicos: forma septicêmica, com amigdalite e mononucleose; forma óculo-ganglionar; forma ganglionar; listeriose do sistema nervoso central; granulomatose séptica; forma cutânea, etc.

Na meningite por *Listeria*, o quadro liquórico é muito semelhante ao encontrado na meningite tuberculosa.

A granulomatose generalizada por *Listeria*, no homem, é caracterizada pelo aparecimento de granulomas miliares, focais (listeriomas).

Quanto à listeriose durante a gravidez, diversos autores registram que a maioria das

mães cujos filhos têm listeriose, referem na gestação infecções do tipo gripal ou "pielite". As alterações histológicas não mostram diferenças fundamentais no modo de reação tissular, em relação aos animais. REISS e col. acham que a listeriose do recém-nascido apresenta o seguinte esquema patogenético: infecção da mãe; passagem transplacentária do microrganismo para o feto; septicemia através da veia umbilical; eliminação do agente causal pela urina no líquido amniótico; infecção do líquido amniótico; aspiração do fluido, com alterações patológicas para o lado do trato respiratório; finalmente, eventual broncopneumonia ou septicemia enterógena.

A listeriose do recém-nascido e a neurolisteriose nos velhos, provoca mortalidade em 70% dos casos. Há formas benignas e assintomáticas da moléstia. A quimioterapia com preparados sulfonamídicos e, recentemente, a introdução dos antibióticos de largo espectro, reduziram a mortalidade para cifras mais baixas.

A listeriose sòmente pode ser diagnosticada à custa do laboratório, principalmente através do isolamento do agente causal.

O exame microscópico do mecônio é essencial para o diagnóstico da listeriose neonatal. Ágar triptose a 2% constitui excelente meio para o isolamento e conservação da *L. monocytogenes*.

Das provas sorológicas, a reação de fixação do complemento com antígenos em fase 0 é a mais indicada (antígenos obtidos por lise ultrassônica). A sôro-aglutinação positiva em título igual ou acima a 1:320 tem valor diagnóstico. Recentemente, um polipeptídeo da *Listeria monocytogenes* tem sido utilizado com finalidade diagnóstica, em provas intradérmicas. Até o presente momento, os métodos bacteriológicos suplantam os testes imunológicos no diagnóstico da listeriose.

Extensa bibliografia finaliza o magnífico e oportuno livro publicado por SEELIGER, categorizado microbiologista alemão.

CARLOS DA SILVA LACAZ